

PANJANG GONAD DAN JUMLAH PRIMORDIAL GERM CELL AYAM WHITE LEGHORN

TRIBUDI, Y. A.¹⁾ DAN T. KOSTAMAN²⁾

¹⁾ Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura,
Basir Laut, Kec. Pontianak Tenggara, Kota Pontianak, Kalimantan Barat 78115

²⁾ Balai Penelitian Ternak, Jl. Veteran III, Ciawi-Bogor 16720
e-mail: yuliariftribudi@gmail.com

ABSTRAK

Primordial germ (PGC) pada unggas memiliki potensi yang signifikan untuk digunakan dalam studi berbasis sel dan pelestarian plasma nuftah unggas. Tujuan dari penelitian untuk mengetahui apakah panjang dan posisi gonad mempengaruhi jumlah PGC. Telur fertil ayam White Leghorn diinkubasi selama 6 hari dan untuk pengamatan peubah ukuran panjang dan jumlah PGC-gonad sisi kanan dan kiri digunakan sampel 27 embrio. *Tweezer* digunakan untuk membersihkan bagian perut dan isinya sampai terlihat bagian mesonephros. Gonad menempel pada bagian mesonephros di sisi kanan dan kiri, kemudian dilakukan pengukuran panjang gonad. Untuk melepaskan gonad dari mesonephros digunakan *tweezer* dan dilakukan secara hati-hati sampai terlepas serta usahakan gonad tidak patah. Selanjutnya dilakukan isolasi PGC-gonad untuk menentukan jumlah sel dengan menggunakan hemocytometer, kemudian dilihat dan dihitung di bawah mikroskop. Hasil pengamatan memperlihatkan ukuran panjang gonad sisi kanan dan kiri tidak memperlihatkan perbedaan (191,56 vs 201,96 μm) ($P > 0,05$). Sementara itu, jumlah PGC dipengaruhi oleh posisi gonad (82,20 vs 122,40 sel) ($P < 0,05$). Dapat disimpulkan, gonad sisi kiri memiliki ukuran yang lebih panjang dan jumlah PGC lebih banyak dibandingkan dengan gonad sisi kanan.

Kata kunci: ayam White Leghorn, posisi, gonad, jumlah, PGC

THE LENGTH GONAD AND NUMBER OF PRIMORDIAL GERM CELL OF WHITE LEGHORN CHICKEN

ABSTRACT

Primordial germ cells (PGCs) in poultry has significant potential for use in cell-based studies and conservation of poultry germplasm. The purpose of this study was to determine whether the length and position of the gonad affect the number of PGCs. The fertilized egg of White Leghorn chicken was incubated for 6 days and for observing variables of length and number of PGC-gonad on the right and left side used 27 embryo samples. Tweezer is used to clean the stomach and its content until visible mesonephros. The gonad attached to the mesonephros on the right and left, then the length of the gonad was measured. To remove the gonad from the mesonephros, a tweezer is used and is carried out carefully until it is released and the gonad are not broken. Next, the PGC-gonad isolation was performed to determine the number of cell using a hemocytometer, then seen and counted under a microscope. The observation showed that the length of the right and left gonad length showed no difference (191.56 vs 201.96 μm) ($P > 0.05$). Meanwhile, the number of PGCs is influenced by the position of the gonad (82.20 vs 122.40 cells) ($P < 0.05$). It can be concluded, the left side gonad has a longer size and the number of PGCs is more than the right side gonad.

Key words: White Leghorn chicken, position, gonad, number, PGC

PENDAHULUAN

Kegiatan preservasi sumber daya genetik umumnya dilakukan dengan metode *in-situ* yang merupakan sistem pemeliharaan di habitat alaminya dan metode

ex-situ dengan memelihara hewan hidup di luar habitat alaminya atau melalui kriopreservasi material genetik (*ex-situ* beku). Preservasi *in-situ* dan *ex-situ* hidup mempunyai keterbatasan dalam hal kapasitas ruang, biaya, strategi perkembangbiakan, dan adanya resiko

yang berkaitan dengan penyakit. Pendekatan saat ini untuk mengatasi keterbatasan preservasi *in-situ* dan *ex-situ* hidup adalah melalui preservasi material genetik, salah satunya dengan *primordial germ cell*.

Primordial germ cell (PGC) adalah nenek moyang dari gamet, berasal dari ekstra embrionik pada ayam dan ditemukan di pulau-pulau darah yang sedang berkembang di daerah kantung kuning telur di bagian depan kepala pada stadia 10-12 (Hamburger dan Hamilton, 1951). Dari sana bermigrasi secara aksial melalui aliran darah, berkonsentrasi pada *sinus terminalis* dan memasuki embrio terutama melalui *vena vitelline anterior* (De Melo Bernardo *et al.*, 2012). *Primordial germ cell* kemudian berjalan melalui pembuluh darah embrionik untuk mencapai *gonadal ridge*. Setelah PGC berkolonisasi di *gonadal ridge* kanan dan kiri mengalami diferensiasi morfologi jenis kelamin dan berkembang menjadi ovarium atau testis sesuai dengan warisan genetiknya.

Berdasarkan pada pola migrasi, PGC dapat dikoleksi pada periode perkembangan embrional yang berbeda. Pertama, PGC dapat diisolasi dari *blastoderm* atau stadia X. Kedua, diisolasi dari darah embrio setelah telur diinkubasi selama 2,5 sampai 3 hari dikenal sebagai PGC-sirkulasi. Ketiga, diisolasi dari gonad embrio setelah telur diinkubasi selama 5,5 sampai 6 hari dikenal sebagai PGC-gonad (Chojbacka-Puchta *et al.*, 2012).

Primordial germ (PGC) pada unggas memiliki potensi yang signifikan untuk digunakan dalam studi berbasis sel dan pelestarian plasma nutfah unggas. Meskipun tidak ada perubahan fenotipik di antara berbagai sumber PGC yang diamati dan pola ekspresi penanda tertentu, namun keuntungan dari PGC gonad dibandingkan dengan sumber lain adalah sejumlah besar PGC dapat diambil hanya dari satu embrio (Park dan Han, 2012).

Dua penggunaan PGC yang sering dilaporkan, yaitu sel-sel ini dapat digunakan untuk konservasi sumber daya genetik dan produksi unggas transgenik (Nakamura *et al.*, 2013). Sementara itu, aplikasi yang utama dari teknologi PGC adalah untuk pelestarian plasma nutfah dari jenis unggas langka (Glover dan McGrew, 2012).

Primordial germ cell (PGC)-gonad pada ayam mempunyai karakteristik morfologi, yaitu memiliki ukuran sel yang besar (12,73-25,11 μm), bentuk bulat dengan kontur tidak teratur, inti yang sperikal dan besar yang letaknya tidak simetris. Selain itu, PGC-gonad mempunyai berat jenis sebesar 1.029-1.040 (Sopiyana *et al.*, 2017).

Berdasarkan beberapa pokok pikiran yang telah diuraikan, maka penelitian bertujuan untuk mengetahui apakah panjang dan posisi gonad mempengaruhi

jumlah PGC. Informasi mengenai panjang dan jumlah PGC-gonad berdasarkan posisi gonad belum banyak dilaporkan dan diharapkan dengan diketahui jumlah PGC-gonad, dapat memberikan informasi untuk program kegiatan preservasi *ex-situ* beku sumber daya genetik ayam lokal/asli Indonesia.

MATERI DAN METODE

Persiapan telur fertil

Telur yang digunakan dalam penelitian adalah telur fertil ayam White Leghorn (WL) sebanyak 30 butir. Telur dibersihkan dengan memakai kapas yang telah dibasahi alkohol 70%. Setelah semua telur dibersihkan, telur dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37,8°C dan kelembaban 60% menggunakan inkubator portable (P-008B Biotype; Showa Furanki, Saitama, Jepang).

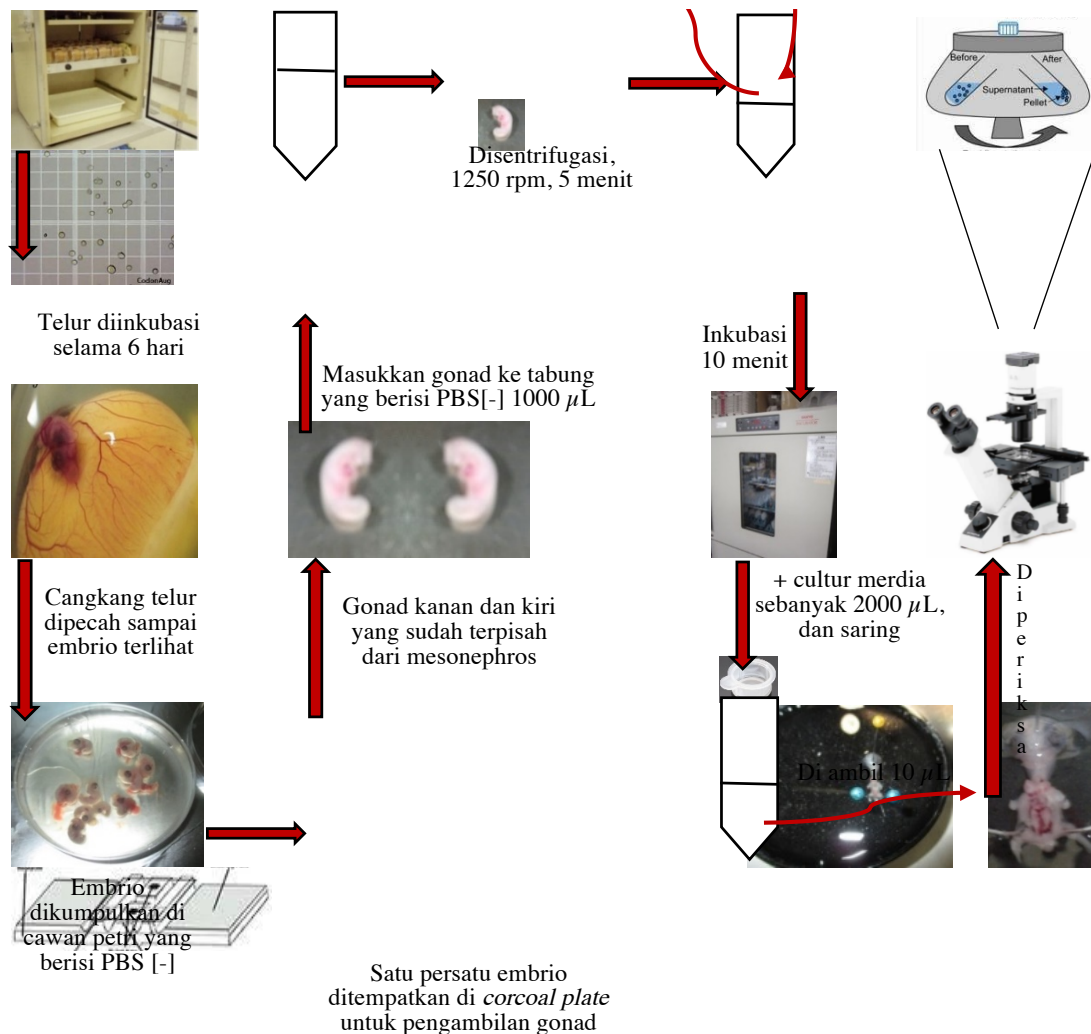
Prosedur pengambilan gonad

Pemanenan embrio diatur sesuai dengan stadia perkembangan embrio umur 6 hari (stadia 29) (Hamburger dan Hamilton, 1951). Telur yang telah berumur 6 hari, diambil dari inkubator dan ditempatkan pada *tray*. Kerabang telur dipecahkan dengan diketuk-ketuk menggunakan pinset pada bagian tumpulnya sampai berlubang kecil. Sambil dijepit, buka perlahan lahan kerabang telur dengan gerakan memutar sampai menjadi lubang besar dan terlihat embrio. Embrio diambil dengan hati-hati dan masukkan ke dalam cawan petri yang telah diisi larutan PBS [-] (Kostaman dan Sopiyana, 2017).

Embrio diambil dan tempatkan dalam *charcoal plate* yang telah diisi larutan PBS [-]. Letakkan embrio dalam



Gambar 1. Gonad embrio ayam, garis hitam menunjukkan panjang gonad sisi kanan dan kiri.



Gambar 2. Skema pengambilan dan isolasi gonad ayam White Leghorn.

charcoal plate dengan posisi bagian perut menghadap keatas. Kemudian tancapkan jarum pentul pada bagian kepala, dan kedua kakinya. Ini dimaksudkan supaya embrio tidak bergerak dan memudahkan selama pengambilan gonad.

Pisahkan atau keluarkan dengan menggunakan pinset tajam (*tweezer*) secara hati-hati bagian perut dan isinya, sehingga terlihat bagian mesonephros. Gonad menempel pada bagian mesonephros di sisi kanan dan kiri. Gonad merupakan bagian yang menempel dan memanjang pada mesonephros. Ini terlihat bahwa gonad berwarna lebih putih. Selanjutnya panjang gonad sisi kanan dan kiri di ukur (Gambar 1).

Secara hati-hati menggunakan pinset tajam (*tweezer*), usahakan gonad dapat di ambil dan tidak sampai terpotong. Gonad hasil pemanenan ditempatkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang berisi larutan PBS [-]. Selama pemanenan berlangsung tempatkan tabung eppendorf 1,5 ml tersebut dalam wadah berisi es batu. Ulangi seterusnya sampai semua gonad terambil.

Isolasi PGC-gonad

Pindahkan masing-masing gonad sisi kanan dan kiri ke dalam tabung ukuran 10 mL yang berisi larutan PBS [-] 1000 μL , kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1250 rpm selama 5 menit. Setelah selesai kemudian keluarkan supernatant. Pisahkan jaringan dengan menambahkan larutan 0,25% Trypsin-EDTA sebanyak 1000 μL , kemudian inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂.

Setelah itu dipipet secara perlahan-lahan, *inactivatekan* tripsin dengan menambahkan PGC kultur media (*culture medium containing 10% FBS*) sebanyak 2000 μL . Kemudian pipet kembali agak lama. Saring sel dengan menggunakan 40 μm BD Falcon TM Cell Strainer (Cat#: 352340). Tentukan jumlah sel dengan menggunakan hemositometer. Siapkan *cover glass*. Di pipet 10 μL larutan sel, kemudian dilihat dan dihitung di bawah mikroskop (Gambar 2).

Peubah

Peubah yang diamati pada penelitian adalah ukuran panjang gonad sisi kanan dan kiri dengan menggunakan bantuan program *software Stream Start* dan jumlah PGC-gonad sisi kiri dan kanan.

Analisis data

Data ukuran panjang gonad dan jumlah PGC-gonad sisi kanan dan kiri dianalisis menggunakan ANOVA (Steel dan Torrie, 1991). Selanjutnya apabila ada perbedaan dilanjutkan dengan uji t-Test menggunakan bantuan program *software SPSS 22*. Untuk mengurangi faktor-faktor luar seperti lingkungan, suhu penyimpanan telur, kelembaban penyimpanan telur, dan faktor lainnya, maka data ukuran panjang gonad dan jumlah PGC-gonad diuji tingkat kenormalan. Uji kenormalan menggunakan uji Kolmogorof-Smirnov Z menggunakan program *software SPSS 22*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Panjang gonad

Berdasarkan hasil pengukuran, gonad sisi kanan dan kiri memperlihatkan tidak ada perbedaan ($P > 0,05$) (Tabel 1). Hasil pengujian kenormalan menunjukkan bahwa data ukuran panjang gonad berdistribusi secara normal ($P > 0,05$). Pada embrio ayam, gonad muncul sebagai penebalan epitel koelomik pada permukaan ventral setiap mesonephros. Gonadogenesis dimulai pada sekitar 72 jam perkembangan embrio (Hamburger dan Hamilton, 1951). Saat perkembangan berlangsung, penampilan morfologi gonad pada awalnya serupa pada jantan dan betina, tetapi setelah lebih dari 10 hari (stadia 36) gonad jantan dan betina berbeda nyata (Guioli *et al.*, 2014).

Tabel 1. Ukuran panjang gonad dan jumlah *primordial germ cell*-gonad ayam White Leghorn

Peubah	Gonad		Uji statistik
	Kanan	Kiri	
Jumlah sampel	27	27	-
Panjang (μm)	191,56 \pm 34,02	201,96 \pm 34,49	$P > 0,05$
Jumlah PGC (sel)	82,20 \pm 2,20	122,40 \pm 2,60	$P < 0,05$

Gonad sisi kiri lebih panjang kurang lebih 10,4 μm dibandingkan gonad sisi kanan. Hal ini disebabkan pada ayam mempunyai ciri khas perkembangan gonad pada anak ayam untuk embrio betina mengembangkan gonad secara asimetris hanya sisi kiri yang membentuk ovarium fungsional sementara sisi kanan mengalami regresi (Smith dan Sinclair, 2004). Selain itu, perkembangan gonad pada burung sisi kiri lebih cepat dibandingkan sisi kanan (Guioli *et al.*, 2014).

Secara teori, perkembangan gonad adalah sebuah

proses berurutan yang dapat dibagi menjadi tiga peristiwa besar yaitu migrasi PGC, penentuan jenis kelamin, dan diferensiasi gonad. Asimetri antara gonad sisi kanan dan kiri meningkat. Gonadogenesis dimulai sekitar 72 jam masa inkubasi (stadia 23) (Hamburger dan Hamilton, 1951). Pada stadia 25, *genital ridges* menonjol ke dalam rongga selom sebagai organ yang berbeda dan disebut *epitel germinal* dalam *epithelial cords*. Beberapa studi menunjukkan berasal dari *germinal epithelium*, sementara yang lain melaporkan dari mesonefrik (Sekido dan Lovell-Badge, 2007). Pada titik ini, organ reproduksi baik jantan dan betina sudah menampilkan morfologi asimetri antara gonad sisi kanan dan kiri, dimana lapisan epitel pada gonad kiri lebih tebal dari yang kanan (Carlon dan Stahl, 1985).

Pada stadia 29, epitel yang mengelilingi gonad kanan rata dan mengadopsi penampilan yang lebih seperti skuamosa, lebih lanjut menekankan asimetri kanan : kiri pada kedua jenis kelamin (Carlon dan Stahl, 1985). Ketika diferensiasi jenis kelamin gonad berlangsung, perbedaan morfologi antara gonad kiri dan kanan pada betina menjadi lebih jelas, sedangkan asimetri antara gonad jantan berkurang.

Jumlah sel

Berdasarkan hasil isolasi yang diperoleh dan perhitungan, Jumlah PGC-gonad bagian sisi kanan dan kiri per embrio menunjukkan jumlah PGC-gonad yang memperlihatkan perbedaan ($P < 0,05$) (Tabel 1). Hasil pengujian kenormalan menunjukkan bahwa data jumlah PGC-gonad sisi kanan dan kiri berdistribusi secara normal ($P > 0,05$).

Rataan jumlah PGC-gonad sisi kiri memiliki jumlah PGC yang lebih banyak dibandingkan dengan sisi kanan. Hal ini disebabkan 70% PGC ditemukan di sisi kiri gonad (Dubois dan Cuminge, 1978; 1979). Nakamura *et al.* (2007) mengatakan bahwa jumlah PGC ditemukan secara konsisten dan secara signifikan lebih tinggi di sisi kiri daripada yang sisi kanan. Tren ini bertahan selama kolonisasi *genital ridge*, sehingga gonad kiri mengandung lebih banyak PGC daripada kanan. Hasil yang sama telah diamati pada anak ayam dan burung lainnya seperti burung puyuh dan itik (Nakamura *et al.*, 2007; Intarapat dan Stern, 2013).

Jika dilihat dari total jumlah PGC-gonad, hasil penelitian lebih rendah dibandingkan dengan hasil PGC-gonad pada ayam yang sama, dimana jumlah PGC-gonad ayam White Leghorn yang dimurnikan dengan metode PBS (-) dengan waktu inkubasi embrio dalam PBS (-) selama 30 menit yaitu 402 sel per embrio pada umur embrio 7 hari (Nakajima *et al.*, 2011). Nakamura *et al.* (2011) melaporkan jumlah PGC yang dipanen dari gonad ayam White Leghorn umur 7 hari yaitu 237 sel per embrio. Selanjutnya Atsumi

et al. (2008) memperoleh jumlah PGC-gonad pada ayam White Leghorn pada umur 6,5 hari sebanyak 404 sel per embrio menggunakan metode deteksi *immunohistochemical* dengan antibodi. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan metode pemurnian sel dan perkembangan umur embrio. Jumlah PGC-gonad dipengaruhi oleh perkembangan embrio, dimana jumlah PGC-gonad secara signifikan meningkat dan mencapai puncaknya pada hari ke-7, karena PGC sebagian besar telah menetap di bagian gonad dan setelah itu jumlah PGC akan menurun (Sopiyana *et al.*, 2017).

Namun, dibandingkan dengan perolehan jumlah PGC-gonad ayam KUB pada umur embrio yang sama hanya mendapatkan jumlah PGC-gonad sebesar 113,7 sel per embrio (Sopiyana *et al.*, 2017). Sementara itu, jumlah PGC-gonad ayam KUB yang dimurnikan dengan metode PBS (-) dengan waktu inkubasi embrio dalam PBS (-) selama 1 jam yaitu 151,47 sel per embrio pada umur embrio 7 hari (Kostaman dan Sopiyana, 2017). Terbukti bahwa jumlah PGC-gonad ayam White Leghorn jauh lebih banyak dibandingkan jumlah PGC-gonad pada ayam lokal/asli Indonesia. Sesuai pendapat Zhao *et al.* (2003) bahwa jumlah PGC ayam ras berkorelasi dengan jumlah telur. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak ayam bertelur, semakin banyak pula jumlah PGC dan setiap *strain* ayam memiliki jumlah PGC yang berbeda-beda. Seperti diketahui produksi telur ayam KUB 160-180 butir/tahun (Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia, 2014), sedangkan ayam White Leghorn mencapai 280-320 butir/tahun (Smith, 2018). Selain itu, bobot telur juga mempunyai hubungan yang sangat erat dengan jumlah PGC (Kostaman, 2017).

Selain pada ayam, Nakajima (2016) melaporkan telah berhasil memperoleh PGC-gonad dari burung bangau Oriental (*Ciconia boyciana*) dan ibis Botak Utara (*Geronticus eremita*) dengan jumlah masing-masing 130 dan 160 sel PGC per embrio.

SIMPULAN

Gonad sisi kiri memiliki ukuran yang lebih panjang dan jumlah PGC lebih banyak dibandingkan dengan gonad sisi kanan. Isolasi PGC-gonad merupakan salah satu pilihan dari koleksi PGC yang ada. Sedemikian sehingga akan mempermudah didalam aplikasi teknologi konservasi dalam rangka mempertahankan keberadaan plasma nutfah unggas lokal/asli yang ada di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Bapak Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura dan Kepala Balai Penelitian Ternak yang sudah mendukung kegiatan penelitian dan teman-teman teknisi yang terlibat langsung di kegiatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Atsumi, Y., T. Tagami, H. Kagami, and T. Ono. 2008. Restriction of germline proliferation by soft X-ray of chicken embryos and its application to chimera production. *J. Poult. Sci.* 45:292-297.
- Carlson, N. and A. Stahl. 1985. Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 74:52-59.
- Chojbacka-Puchta, L., K. Kasperczyk, G. Plucienniczak, D. Sawicka, and Bednarczyk. 2012. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Polish J. Vet. Sci.* 15:181-188.
- De Melo Bernardo, A., K. Sprenkels, G. Rodrigues, T. Noce, and S.M. Chuva De Sousa Lopes. 2012. Chicken primordial germ cells use the anterior veins to enter the embryonic circulation. *Biol. Open.* 1:1146-1152.
- Dubois, R. and D. Cuminge. 1978. Statistical study of the primary asymmetry in primordial germ cells distribution in the chick embryo. *C R Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D.* 286:1613-1616.
- Dubois, R. and D. Cuminge. 1979. The cause of the primary asymmetry of germ cell distribution in the gonadal primordial of chick embryo. *C R Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* 288:895-898.
- Glover, J.D. and M.J. McGrew. 2012. Primordial germ cell technologies for avian germplasm cryopreservation and investigating germ cell development. *J. Poult. Sci.* 49:155-162.
- Guioli, S., S. Nandi, D. Zhao, J.B. Shannon, R.L. Badge, and M. Clinton. 2014. Gonadal asymmetry and sex determination in birds. *Sex Dev.* 8:227-242. DOI: 10.1159/000358406
- Hamburger, V. and H.L. Hamilton. 1951. A series of normal stages in development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88:49-92.
- Intarapat, S. and C.D. Stern. 2013. Sexually dimorphic and sexindependent left-right asymmetries in chicken embryonic gonads. *PloS One.* 8:e69893.
- Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia. 2014. Pelepasan galur ayam KUB-1. Jakarta.
- Kostaman, T. 2017. Jumlah PGC-sirkulasi itik Mojosari dan Peking Mojosari putih (PMP) dilihat dari bobot telur. Di dalam: *Teknologi dan Agribisnis Peternakan untuk Mendukung Ketahanan Pangan.*

- Prosiding Seminar Nasional Teknologi dan Agribisnis Peternakan Seri V. Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman; Purwokerto, 18 November 2017. Fakultas Peternakan UNSOED, Purwokerto. Halaman 426-431.
- Kostaman, T. dan S. Sopiya. 2015. Isolasi *gonadal germ cell* (GGC) dari perkembangan awal embrio ayam Kampung Unggul Badan Litbang Pertanian (KUB). Di dalam: Pengembangan Sumber Daya Lokal Dalam Agribisnis Peternakan. Prosiding Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan 7. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Sumedang, 11 November 2015. Fakultas Peternakan UNPAD, Sumedang. Halaman 44-48.
- Kostaman, T. dan S. Sopiya. 2017. Primordial germ cell profile incubated for 24 hours in the phosphate buffer saline [-] solution. *JITV*. 22:144-150. DOI: <https://dx.doi.org/10.14334/jitv.v22i3.1802>
- Nakajima, Y., H. Fukuda, M. Onuma, K. Murata, M. Ueda, E. Sunaga, T. Shiraishi, and A. Tajima. 2016. Migratory ability of gonadal germ cells (GGCs) isolated from *Ciconia boyciana* and *Geronticus eremita* embryos into the gonad of developing chicken embryos. *J. Vet. Med. Sci.* 78:1055-1058.
- Nakajima, Y., T. Minematsu, M. Naito, and A. Tajima. 2011. A new method for isolation viable gonadal germ cells from 7-day-old chick embryos. *J. Poult. Sci.* 48:106-111.
- Nakamura, Y., F. Usui, D. Miyahara, T. Mori, H. Watanabe, T. Ono, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2011. Viability and functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chicken. *J. Poult. Sci.* 48:57-63.
- Nakamura, Y., H. Kagami, and T. Tagami. 2013. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Dev. Growth Differen.* 55:20-40.
- Nakamura, Y., Y. Yamamoto, F. Usui, T. Mushika, T. Ono, A.R. Setioko, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2007. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult. Sci.* 86:2182-2193.
- Park, T.S. and J.Y. Han. 2012. Piggybac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:9337-9341.
- Rodemer-Lenz E. 1989. On cell contribution to gonadal soma formation in quail-chick chimeras during the indifferent stage of gonadal development. *Anat. Embryol. (Berl)* 179:237-242.
- Sekido, R. and R. Lovell-Badge. 2007. Mechanisms of gonadal morphogenesis are not conserved between chick and mouse. *Dev. Biol.* 302:132-142.
- Smith, C.A. and A.H. Sinclair. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*. 26:120-132.
- Smith, K. 2018. Leghorn (White Leghorn): A comprehensive guide. <https://www.backyardchickencoops.com.au/blogs/learning-centre/leghorn-white-leghorn-a-comprehensive-guide>. Diakses 12 Juni 2020.
- Sopiya, S., M.A. Setiadi, M. Fahrudin, dan I. Supriatna. 2017. Isolation and number of gonadal primordial germ cells (gonadal PGCs) on the stages of early embryonic development of KUB chicken. *Media Peternakan*. 40:1-6. DOI: <https://doi.org/10.5398/medpet.2017.40.1.1>
- Steel, R.G.D. and J. H. Torrie. 1991. Principles Procedures of Statistics A Biometrical Approach. Translated by Bambang Sumantri. 1993. Principles and procedures of statistics: A biometric approach. Gramedia. Jakarta.
- Zhao, D.F., H. Yamashita, M. Matsuzaki, T. Takano, S. Abe, M. Naito, and T. Kuwana. 2003. Genetic factors affect the number of circulating primordial germ cells in early chick embryos. *J. Poult. Sci.* 40:101-113.