

Primordial Germ Cells (PGCs) Embrio Ikan Nilem (*Osteochilus vittatus*) pada Beberapa Tahap Perkembangan

Aulidya Nurul Habibah^{*1}, Gratiana Ekaningsih Wijayanti²

¹Prodi S1 Biologi Terapan, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto 53122, Indonesia

²Prodi S1 Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto 53122, Indonesia

*Corresponding author, Email: aulidya.nurul.habibah@unsoed.ac.id

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 02/02/2024

Disetujui : 21/03/2024

Abstract

Primordial Germ Cells (PGCs) are gametes precursors that are important in fish reproduction. PGCs are allocated outside the gonad and migrate towards the gonad primordia during fish embryonal development. Knowledge of the allocation and migration of PGCs is important in the development of gametogenesis research models and improved aquaculture production. This research aims to determine the location of PGCs in the embryo stage of Nilem fish using the in situ hybridization method with vasa germ cell markers of Nilem fish. Nilem fish embryos aged 30 minutes, 60, 180 and 240 minutes after fertilization were fixed in 10% NBF then dechorionated. Next, in situ hybridization was carried out with the Nilem fish vasa germ cell marker. PGCs were found in the area around the blastomere cleavage groove in embryos aged 30 minutes, 60 minutes and detected in the blastoderm of animal pole region in embryos aged 18 minutes and 240 minutes which had entered the blastula and gastrula stages.

Key Words: Embryo, In situ hybridization, *Osteochilus vittatus*, Primordial Germ Cells, Vasa.

Abstrak

Primordial Germ Cells (PGCs) merupakan prekursor gamet yang penting dalam reproduksi ikan. PGCs dialokasikan di luar gonad dan bermigrasi menuju gonad primordia selama masa perkembangan embrional ikan. Pengetahuan mengenai alokasi dan migrasi PGCs penting dalam pengembangan model penelitian gametogenesis dan peningkatan produksi akuakultur. Penelitian ini bertujuan mengetahui lokasi PGCs pada tahap embrio ikan Nilem menggunakan metode hibridisasi in situ dengan penanda vasa germ cell ikan Nilem. Embrio ikan Nilem umur 30 menit, 60, 180 dan 240 menit paska fertilisasi difiksasi dalam NBF 10% kemudian didechorionasi. Selanjutnya dilakukan hibridisasi in situ dengan penanda vasa germ cell ikan Nilem. PGCs pada embrio ikan Nilem ditemukan pada daerah di sekitar alur pembelahan blastomere pada embrio umur 30 menit, 60 menit dan terdeteksi pada blastoderm di daerah kutub animalis pada embrio umur 18 menit dan 240 menit yang telah memasuki tahapan blastula dan gastrula.

Kata kunci: Embrio, Hibridisasi in situ, *Osteochilus vittatus*, Primordial Germ Cells, Vasa.

PENDAHULUAN

Primordial germ cells (PGCs) atau sel germinalis merupakan prekursor gamet yang penting dalam reproduksi ikan. PGCs dialokasikan di luar gonad primordia dan bermigrasi menuju gonad primordia selama masa perkembangan embrional. PGCs memiliki peran dalam pewarisan informasi genetik dari induk ke anakan (Cao *et al.*, 2012). Yoshikawa *et al.* (2018) menyatakan bahwa PGCs dapat mempengaruhi fertilitas ikan spesies hybrid. Salah satu mekanisme yang berperan dalam fertilitas adalah penahanan mitosis PGCs yang dapat menyebabkan infertilitas pada ikan hybrid.

PGCs memiliki karakteristik sel unipotent. Karakteristik tersebut diantaranya memiliki aktivitas alkalin fosfatase dan ekspresi gen-gen spesifik pada tahap perkembangan embrio (Miguel *et al.*, 2017). Pengetahuan mengenai identifikasi, determinasi PGCs selama perkembangan embrio dilakukan untuk mengetahui kapan dan dimanakah PGCs berasal/muncul selama perkembangan embrio kemudian bermigrasi menuju gonad primordia. Adapun penelitian mengenai *germ cells* telah banyak

dilakukan pada *Drosophila*, katak dan embrio tikus. Pengetahuan mengenai migrasi PGCs pada masa embrional ikan, sangat penting kaitannya untuk mempelajari proses migrasi sel tunggal secara *in vivo*. Mekanisme yang mendasari migrasi dan tujuan migrasi PGCs harus jelas untuk memastikan PGCs sampai pada organ target sehingga berkontribusi terhadap fertilitas organisme (Aalto *et al.*, 2021).

Informasi mengenai *primordial germ cells* sangat penting kaitannya dengan perkembangan gonad ikan. Pengetahuan mengenai *germ cells*, termasuk didalamnya PGCs dapat digunakan untuk usaha rekayasa dalam bidang akuakultur dan untuk penelitian perkembangan. Cantú and Laird (2017) menyatakan bahwa banyak hal yang dapat dipelajari dari mekanisme migrasi PGCs menuju gonad primordia sebagai pengetahuan fundamental maupun potensi fungsional. Pengetahuan mengenai PGCs termasuk aspek migrasinya dapat dijadikan dasar aplikasi gametogenesis *in vitro*. PGCs juga dapat diisolasi dan dikultur secara *in vitro*. Teknik isolasi dan kultur *in vitro* PGCs telah banyak dilakukan pada mamalia (Miguel *et al.*, 2017). Lebih lanjut, Coelho

et al. (2019) melakukan penelitian mengenai PGCs ikan neotropis *Prochilodus lineatus*. PGCs pada ikan tersebut dapat ditransplantasikan dan dapat dimanipulasi untuk menghasilkan chimera sel germinal. Lin *et al.* (2012) menggunakan ikan medaka untuk melabeli sel-sel germinal khususnya PGCs sehingga dapat digunakan untuk manipulasi sel germinal pada ikan rainbow trout yang merupakan ikan budidaya bernilai ekonomis penting. Melalui pendekatan ikan model yaitu medaka, diharapkan selanjutnya labeling sel germinal dapat diaplikasikan ke ikan rainbow trout untuk manipulasi sebagai upaya peningkatan produksi ikan tersebut. Percobaan mengenai transplantasi oogonia dan spermatogonia berhasil dilakukan pada ikan masu salmon oleh Lee *et al.* (2021). Oogonia dan spermatogonia diinjeksikan ke rongga peritoneum ikan masu salmon triploid, dan menghasilkan gamet yang terdiferensiasi dengan rasio kelamin anakan 1:1.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada beberapa jenis ikan, mengetahui alokasi PGCs dan migrasinya menjadi pengetahuan yang bermanfaat bagi ilmu pengetahuan maupun sektor perikanan. PGCs dapat diisolasi kemudian dikultur secara *in vitro*. Teknik isolasi dan kultur *in vitro* PGCs telah banyak dilakukan pada mamalia (Miguel *et al.*, 2011). Pengetahuan mengenai PGCs termasuk aspek migrasinya dapat dijadikan dasar aplikasi gametogenesis *in vitro*. Coelho *et al.* (2019) melakukan penelitian mengenai PGCs ikan neotropis *Prochilodus lineatus*. PGCs pada ikan tersebut ditransplantasikan dan dapat dimanipulasi untuk menghasilkan chimera sel germinal. Manipulasi PGCs bertujuan untuk meningkatkan produksi ikan. Pada penelitian ini, ikan Nilem digunakan sebagai model penelitian karena merupakan spesies indigenus kabupaten Banyumas yang sudah dibudidayakan dan mudah didapatkan dari pembudidaya serta memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi. PGCs embrio ikan Nilem dideteksi menggunakan vasa homolog penanda *germ cell* ikan Nilem pada penelitian ini.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian embrio ikan Nilem diperoleh melalui fertilisasi terbantu di laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman. Bahan untuk hibridisasi *in situ* meliputi *probe vasa germ cells O. vittatus* (Wijayanti, belum dipublikasikan) dan bahan untuk pre hibridisasi, tahap hibridisasi dan post hibridisasi menggunakan kit dari BioTNA Biospot kit dan *Neutral Buffered Formaline* (NBF) 10% untuk fiksasi embrio. Alat-alat yang digunakan meliputi alat untuk dechorionasi embrio ikan Nilem meliputi jarum spuit 1 mL, *object glass* dan mikroskop cahaya merk Olympus, peralatan hibridisasi *in situ* meliputi inkubator, *humidity chamber*, *waterbath*.

Penelitian dilakukan menggunakan metode observasi dan dianalisis secara deskriptif. Prosedur

penelitian terdiri atas fiksasi embrio ikan Nilem umur 30 menit, 60 menit, 180 menit dan 240 menit paska fertilisasi, dechorionasi embrio ikan Nilem, hibridisasi dan observasi hasil hibridisasi *in situ*.

Embrio ikan Nilem diperoleh dengan pemijahan terbantu di laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Induk ikan Nilem Jantan dan betina matang kelamin diinduksi menggunakan GnRH analog merk Ovaprim dengan dosis 0.5 mL/kg untuk induk betina dan 0.3 mL/kg untuk induk jantan (Simanjuntak dan Wijayanti 2005). Setelah delapan jam dari induksi Ovaprim, ikan betina distripping pada area abdomen menuju lubang urogenital. Telur yang keluar ditampung. Stripping juga dilakukan pada induk Nilem Jantan dengan mengurut abdomen menuju lubang urogenital. Sebelum diurut, area di sekitar lubang urogenital dibersihkan dan dipastikan kering untuk menghindari aktivasi terlalu dini pada spermatozoa. *Milt* yang berisi spermatozoa yang keluar dari lubang urogenital ditampung kemudian dicampurkan dengan telur. Air ditambahkan sedikit demi sedikit dan perlahan untuk aktivasi spermatozoa. Telur diamati apakah sudah berhasil difertilisasi dengan munculnya membran vitelin yang membesar dan terbentuk hillock. Pada menit ke-30, 60, 180 dan 240 paska fertilisasi, embrio ikan diambil dan difiksasi dalam NBF 10% untuk tahap selanjutnya. Pengambilan embrio pada menit ke 30, 60, 180 dan 240 paska fertilisasi dilakukan dengan asumsi embrio pada tahapan yang berbeda, mulai dari 4 sel, 16 sel, blastula hingga gastrula (Nugrahesthi *et al.*, 2023).

Dechorionasi dilakukan mengacu pada Habibah *et al.* (2022). Tahap hibridisasi *in situ* terdiri atas : tahapan persiapan, tahapan pre-treatment, tahapan denaturasi dan hibridisasi, tahapan post hibridisasi dan deteksi. Tahap persiapan meliputi pembuatan larutan heat pre-treatment (larutan *heat pre-treatment* 20x dilarutkan dalam air terdeionisasi dan dipanaskan pada suhu 95°C), menyiapkan buffer SSC 1X dan 2X, membuat larutan pencuci TBST buffer, menyiapkan semua reagen (*Enzyme Solution*, *Anti-DIG antibody*, *Polymer HRP labeling*, *Nuclear Blue Solution*) pada suhu ruang dan pembuatan larutan DAB (kromogen DAB dilarutkan (20x) dilarutkan dalam buffer DAB dan dicampur merata). Tahap *pre-treatment* diawali dengan pencucian PBST dan de-peroksidasi dalam *hydrogen peroksidase block* selama 10 menit, dilanjutkan dengan pencucian dengan PBST, diikuti dengan inkubasi pada larutan *heat pre-treatment* dalam suhu 95°C selama 30 menit. Kemudian sampel didiamkan 15 menit dan diberi air deionisasi dilanjutkan dengan tahap aplikasi enzim hibridisasi *in situ* dalam *humidity chamber* pada suhu 37°C selama 10 menit diikuti dengan dehidrasi dalam alkohol bertingkat: 70%, 85%, 95%, 2x 100% selama masing-masing 2 menit kemudian dikering anginkan. Tahap hibridisasi dan denaturasi merupakan tahap aplikasi *probe* pada sampel embrio ikan dan

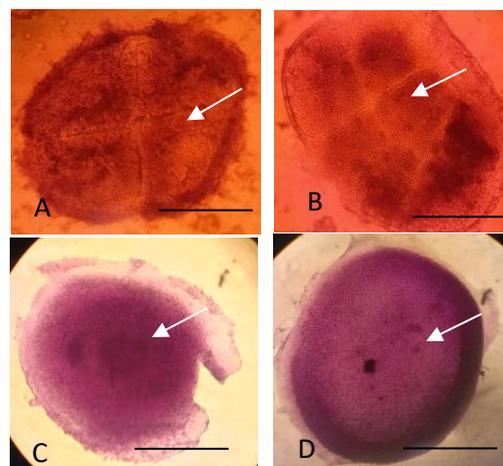
denaturasi pada suhu 96°C selama 10 menit, dilanjutkan dengan hibridisasi dalam *humidity chamber* pada suhu 37°C selama 2-16 jam. Tahap post-hibridisasi dan deteksi diawali dengan merendam sampel pada larutan *Saline Sodium Citrate* (SSC) 2x lalu SSC 1x pada suhu 45°C. Hal ini dilakukan dengan tujuan membersihkan *unbinding probe* pada sampel. Kemudian sampel dicuci dengan buffer 1X *phosphate-buffered saline solution* (PBST). Selanjutnya diaplikasikan reagen *Hi-Effekt Block* pada sampel dan inkubasi selama 30 hingga 60 menit pada suhu ruang dalam *humidity chamber* untuk mengurangi *background* pewarna non-spesifik. Kemudian dicuci dengan buffer 1X PBST selama 5 menit. Selanjutnya Avidin HRP labeling ditetaskan pada sampel dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam *humidity chamber*. Sampel dicuci dalam buffer 1X PBST selama 1 menit sebanyak 3 kali (dalam tahap ini, disiapkan DAB *working solution* yaitu dengan melarutkan DAB chromogen (20X) dalam 19 kali volume DAB buffer). Larutan DAB *working solution* ditetaskan pada sampel dan diamati pada mikroskop selama perkembangan warna dan diakhiri dengan penggunaan buffer PBST untuk menghilangkan larutan DAB. Sampel kemudian ditetesi air keran dan dicuci selama 2 menit. Sampel diberi counterstain dengan larutan *Nuclear Blue* selama 1-3 menit. Kemudian kembali dicuci dengan air keran, lalu dilakukan dehidrasi bertingkat dalam alkohol 70%, 85%, 95%, dan 100%, masing-masing selama 2 menit. Sampel dikering anginkan dan diamati dengan mikroskop cahaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hibridisasi *in situ* merupakan sebuah teknik laboratorium yang dilakukan untuk melokalisir sekuens RNA atau DNA pada sampel biologi. Jaringan atau sel dipaparkan atau diberi *probe* yang merupakan sepotong DNA *single-stranded* yang berikatan dengan pewarna kimia atau fluoresens.

Probe yang telah dilabeli tersebut akan berikatan dengan sekuens yang sesuai pada sampel biologi. Lokasi tempat berikatan antara *probe* dengan sekuens target tersebut dapat diamati dengan mikroskop (*National Human Genome Institute*, 2024). Pada penelitian ini, hibridisasi *in situ* dilakukan pada embrio ikan nilem dalam tahapan 4 sel, 16 sel, morula dan blastula. Pada tahap tersebut, PGCs dapat dideteksi dan dilokalisir keberadaannya menggunakan penanda vasa.

Primordial germ cells (PGCs) mewariskan faktor maternal spesifik seperti vasa dan *nanos 1* (*nos1*) mRNA (Saito *et al.*, 2006). Pada penelitian ini, marker yang digunakan dalam hibridisasi *in situ* adalah sekuens pasangan basa pada vasa *germ cells* *O. vittatus*. Deteksi yang dilakukan pada tahapan embrio umur 30 menit, 60 menit, 180 menit dan 240 menit paska fertilisasi. Tahapan ini mewakili beberapa tahapan embrio ikan nilem sebelum menetas dari *chorion*, merujuk pada Nugrahesthi *et al.* (2023). Embrio umur 30 menit paska fertilisasi menunjukkan tahapan empat sel dengan hasil hibridisasi *in situ* pada gambar 1. Bagian masing-masing blastomer embrio ikan nilem terlihat jelas seperti sebuah area dengan garis/ alur yang memisahkan masing-masing area tersebut. Satu area hasil pembelahan segmentasi merupakan blastomer. Berdasarkan pengamatan di bawah mikroskop, terdapat konsentrasi masa yang terwarnai dengan metode hibridisasi *in situ* menggunakan vasa *germ cells* ikan nilem. Konsentrasi masa yang diduga sebagai PGCs terdapat pada daerah dekat alur pembelahan di salah satu blastomere. Demikian pula pada embrio ikan nilem umur 60 menit paska fertilisasi, ditemukan konsentrasi masa yang terwarnai di dekat alur pembelahan pada salah satu blastomer (Gambar 1, A, B). Pada embrio umur 180 menit dan 240 menit, PGCs terdeteksi di daerah blastoderma (Gambar 1, C, D).



Gambar 1. Embrio ikan nilem (*O. vittatus*) umur 30 menit (A), 60 menit (B), 180 menit (C) dan 240 menit (D) paska fertilisasi dengan hibridisasi *in situ* menggunakan penanda vasa homolog. PGCs ditunjukkan dengan tanda panah. Perbesaran 4x. Bar menunjukkan 100 μ m.

Yoon *et al.* (1997) mempelajari tentang vasa pada ikan zebrafish. Hasil *Northern blotting* menunjukkan bahwa transkrip homolog (vas) vasa ikan zebrafish muncul pada embrio setelah pembuahan, kemungkinan disuplai secara maternal. Pada penelitian ini, vasa *germ cells* menandai PGCs pada tahapan embrio 30 menit setelah fertilisasi (tahap 4 sel) dan dideteksi keberadaannya pada tahap selanjutnya, 60 menit, 180 menit dan 240 menit paska fertilisasi. Pola vasa RNA pada embrio ikan zebrafish telah diteliti menggunakan *wholemout* hibridisasi *in situ*, dari satu -sel tahap perkembangan hingga 10 hari. Hasil menunjukkan bahwa vas RNA adalah penanda spesifik sel germinal, memungkinkan deskripsi PGCs ikan zebrafish untuk pertama kalinya. Transkrip vasa terdeteksi dalam pola baru, terlokalisasi ke bidang pembelahan dalam tahap sel 2 dan 4 embrio. Selama pembelahan berikutnya, RNA dipisahkan sebagai kelompok subseleuler ke sejumlah kecil sel yang mungkin akan berkembang menjadi sel germinal. Berdasarkan hasil penelitian ini, memungkinkan adanya cara terbaru untuk manipulasi genetik pada ikan zebrafish. Selain itu, pengetahuan mengenai vasa RNA akan menjadi dasar studi lebih lanjut tentang pola lokalisasi RNA baru dan perkembangan *germ-line* secara umum. Wang *et al.* (2015) menyatakan bahwa deteksi PGCs menggunakan metode histologi hanya dapat dilakukan setelah tahapan gastrula. Pada penelitian ini, embrio dalam tahapan empat sel, 16 sel, blastula, dan awal gastrula, maka digunakan metode deteksi menggunakan embrio utuh (*whole mount*).

Zhou *et al.* (2020) meneliti pola ekspresi vasa pada perkembangan gonad pada ikan vivipar rockfish (*Sebastes schlegelii*) (Ssvas) menggunakan hibridisasi *in situ*. Hasil menunjukkan bahwa Ssvas gagal dalam lokalisasi di alur pembelahan sampai akhir tahap gastrula, ketika PGC muncul dan bermigrasi ke genital ridge dan terbentuk gonad primordia memanjang saat 10 hari setelah lahir. Kajian perkembangan PGC pada lalat, ikan, burung, amfibi dan mamalia menunjukkan keragaman jalur migrasi yang mengejutkan dengan variasi jalur yang banyak serta mekanisme molekuler yang mendasarinya. Pada umumnya, migrasi dimulai dari posterior embrio di sebagian besar organisme (Cantú and Laird, 2017). Nagasawa *et al.* (2013) berhasil mengidentifikasi PGCs ikan salmon menggunakan *whole mount* hibridisasi *in situ*. Pola distribusi PGCs pada salmon berbeda dengan ikan zebrafish; yaitu spesifik pada tahapan mid-blastula, sel-sel yang mengekspresikan vasa secara acak terdistribusi pada bagian blastodisc, dan kemudian bermigrasi ke daerah *embryonic shield*. Pada penelitian ini, PGCs ditemukan di area ventral blastoderma pada tahapan blastula dan gastrula (umur embrio 180 menit dan 240 menit paska fertilisasi).

Hibridisasi *whole mount in situ* adalah salah satu metode yang sangat kuat untuk mempelajari ekspresi gen selama masa perkembangan embrio.

Hibridisasi *in situ* dengan fluorescence adalah salah satu metode untuk mengetahui ekspresi gen atau beberapa gene overlapping pada embrio ayam. Metode ini menjadi salah satu metode yang dapat dikolaborasikan dengan imunohistokimia ataupun tunggal hanya hibridisasi *in situ* (Denkers *et al.*, 2004). Metode hibridisasi *in situ* dengan fluoresen digunakan oleh Li *et al.* (2019) untuk mengetahui ekspresi vasa pada ikan yellow croaker *Larimichthys croceus*. Metode hibridisasi *whole mount in situ* yang dilakukan pada ikan cod, salmon dan zebrafish untuk mengetahui ekspresi gen nanos pada calon PGCs (Škugor *et al.*, 2014). Vauti *et al.* (2020) mengembangkan hibridisasi *whole mount in situ* untuk mengetahui ekspresi gen pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*). Pada penelitian ini digunakan hibridisasi *in situ* embrio, dan dapat disebut sebagai hibridisasi *whole mount in situ* karena digunakan embrio utuh yang telah didechorionasi.

SIMPULAN

Deteksi PGCs pada embrio ikan nilem dapat dilakukan menggunakan metode hibridisasi *whole mount in situ* dengan penanda vasa. Embrio didechorionasi terlebih dulu dan difiksasi dalam NBF 10% sebelum masuk tahapan hibridisasi *in situ*. PGCs terdeteksi sebagai kumpulan masa yang menyerap warna kuat pada daerah di sekitar celah/ alur antar blastomer pada embrio ikan nilem di umur 30 menit dan 60 menit paska fertilisasi. Pada embrio umur 180 menit dan 240 menit paska fertilisasi, embrio dalam tahap blastula hingga gastrula awal, PGCs terdeteksi pada daerah ventral blastoderma di area kutub animalis. Deteksi pada tahapan larva ikan nilem perlu dilakukan untuk mengetahui alur migrasi PGCs selama perkembangan embrio.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih penulis sampaikan kepada LPPM Universitas Jenderal Soedirman. Penelitian ini dilaksanakan menggunakan pendanaan LPPM Universitas Jenderal Soedirman skema Riset Dasar.

DAFTAR REFERENSI

- Aalto A, Olguin-Olguin A and Raz E E. 2021. Zebrafish Primordial Germ Cell Migration. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:684460.
- Cantú, A. V., Diana J. Laird. 2017. A Pilgrim's Progress: Seeking Meaning In Primordial Germ Cell Migration. *Stem Cell Research* (24), pp. 181–187.
- Cao, M., Y. Yang, H. Xu, J. Duan, N. Cheng, J. Wang, W. Hu, H. Zhao. 2012. Germ cell specific expression of Vasa in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 162, pp. 163–170.
- Coelho, G. C.Z., I. S. Yo, T. M. Mira-López, P. S. Monzani, D. R. Arashiro, T. Fujimoto, J. A. Senhorini and G. S. Yasui. 2019. Preparation Of

- A Fish Embryo For Micromanipulation: Staging Of Development, Removal Of Chorions And Traceability Of PGC In *Prochilodus Lineatus*. *Int. J. Dev. Biol.* 63, pp. 57-65.
- Denkers, N., P. G.-Villalba, Ch. K. Rodesch, K. R. Nielson, and T. Jo Mauch. 2004. FISHing for Chick Genes: Triple-Label Whole-Mount Fluorescence In Situ Hybridization Detects Simultaneous and Overlapping Gene Expression in Avian Embryos. *Developmental Dynamics* 229, pp. 651–657
- Habibah, AN, Pertiwi RPC, Sulistyio I. 2022. Toksisitas limbah cair batik terhadap perkembangan embrio ikan nilem (*Osteochilus vittatus*). *Prosiding Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan XI*. Purwokerto, 12-13 Oktober 2021.
- Lee, S., Woo Young Bang, Hee-Sun Yang, Dae-Sung Lee, Ha Yeun Song. 2021. Production Of Juvenile Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*) From Spermatogonia-Derived Sperm And Oogonia-Derived Eggs Via Intraperitoneal Transplantation Of Immature Germ Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* .535
- Li, Yu, W. Song, Y. Fei Zhu, T. Yu Zhu, L. Bo Ma, M. You Li. 2019. Evolutionarily conserved vasa identifies embryonic and gonadal germ cells in spinyhead croaker *Collichthys lucidus*. *J Fish Biol.*, pp. 1–9.
- Lin, F., Qinghua Liu, Mingyou Li, Zhendong Li, Ni Hong, Jun Li, Yunhan Hong. 2012. Transient and Stable GFP Expression in Germ Cells by the vasa Regulatory Sequences from the Red Seabream (*Pagrus major*). *Int. J. Biol. Sci.* 8 8(6), pp. 882-890
- Miguel, M. P. De, Yago Alcaina and Diego Sainz de la Maza. 2017. Primordial Germ Cell Reprogramming.
- Nagasawa, K. Jorge M.O. Fernandes, Goro Yoshizaki, Misako Miwa, And Igor Babiak. 2013. Identification and Migration of Primordial Germ Cells in Atlantic Salmon, *Salmo salar*: Characterization of Vasa, Dead End, and Lymphocyte Antigen 75 Genes. *Molecular Reproduction & Development* 80, pp. 118–131.
- National Human Genom Institute. 2024. In Situ Hybridisation. [Online] Tersedia pada: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/in-situ-hybridization> [Diakses 22 Februari 2024].
- Yoon, Ch., Koichi Kawakami and Nancy Hopkins. 1997. Zebrafish Vasa Homologue RNA Is Localized To The Cleavage Planes Of 2- And 4-Cell-Stage Embryos And Is Expressed In The Primordial Germ Cells. *Development* 124, pp. 3157-3166.
- Nugrahesthi, G.H., Wijayanti, G.E. And Habibah, A.N., 2023. Embryo and larvae development of Nilem Fish, *Osteochilus vittatus* reared in batik liquid waste. *Nusantara Bioscience*, 15(1).
- Saito, Taiju, T. Fujimoto, Sh. Maegawa, K. Inoue, Minoru Tanaka, Katsutoshi Arai and Etsuro Yamaha. 2006. Visualization of Primordial Germ Cells In Vivo. *Int. J. Dev. Biol.* 50, pp. 691-700.
- Simanjuntak SBI, Wijayanti GE. 2005. Penggunaan hormon untuk inkubasi pemijahan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*). *Prosiding Seminar Nasional Biologi dan Akuakultur Berkelanjutan*. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Škugor, A. Krasimir Slanchev, J. Seilø Torgersen, H. Tveiten, Ø. Andersen. 2014. Conserved Mechanisms for Germ Cell-Specific Localization of nanos3 Transcripts in Teleost Species with Aquaculture Significance. *Mar Biotechnol*, 16, pp. 256–264.
- Vauti F, Stegemann LA, Voögele V, KoösterRW.2020. All-Age Whole Mount In Situ Hybridization To Reveal Larval And Juvenile Expression Patterns In Zebrafish. *PLoS ONE* 15(8): e0237167.
- Wang, X., Qinghua Liu, Yongshuang Xiao, Yang Yang, Yanfeng Wang, Zongcheng Song, Feng You, Hao An, Zhizhong Xiao, Shihong Xu, Daoyuan Ma, and Jun Li. 2015. The dnd RNA Identifies Germ Cell Origin and Migration in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) *BioMed Research International Vol.*, Article ID 428591, 9
- Yoon, Ch., Koichi Kawakami and Nancy Hopkins. 1997. Zebrafish Vasa Homologue RNA Is Localized To The Cleavage Planes Of 2- And 4-Cell-Stage Embryos And Is Expressed In The Primordial Germ Cells. *Development* 124, pp. 3157-3166.
- Yoshikawa,H., D. Xu, Y. Ino, T. Yoshino, T. Hayashida, J. Wang, R. Yazawa, G. Yoshizaki, and Y. Takeuchi. 2018. Hybrid Sterility in Fish Caused by Mitotic Arrest of Primordial Germ Cells. *Genetics Society of America*.
- Zhou Li, Xueying Wang, Shuran Du, Yanfeng Wang, Haixia Zhao, Tengfei Du1, , Jiachen Yu, Lele Wu, Zongcheng Song, Qinghua Liu and Jun Li. 2020. Germline Specific Expression of a vasa Homologue Gene in the Viviparous Fish Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*) and Functional Analysis of the vasa 30 Untranslated Region. *Front. Cell Dev. Biol.*, 28 October 2020.