

Peningkatan Mutu Genetik Ternak Besar melalui Teknologi Transplantasi Sel Punca Spermatogonia

(Livestock Genetic Improvements through Spermatogonial Stem Cell Transplantation Technology)

Suyatno

Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Kepulauan Bangka Belitung, Jalan Mentok Km. 4 Pangkalpinang, Indonesia
Kontributor utama: suyatno19@yahoo.com

(Diterima 27 Juli 2021 – Direvisi 25 Oktober 2021 – Disetujui 7 Desember 2021)

ABSTRACT

Stem cells are unique cells that have the ability to differentiate into cells with specific functions and renew themselves to produce new stem cells. One type of stem cells that are actively studied is Spermatogonial Stem Cells (SSC). SSC is a unipotent cell that develops into spermatozoa in the mammalian testis. SSC can be transplanted into male testis recipients to improve the genetic quality of livestock and propagate valuable livestock. SSC transplantation procedure is started from the isolation of SSC from testis of the donor animal, *in vitro* culture of SSC for propagation or genetic modification, preparations of recipient males, and transplant SSC into recipient males to produce normal sperm that can fertilize the egg. SSC transplantation technology has been successfully applied to large animals such as cattle, goats, sheep, buffalo, pigs, other mammals such as monkeys. SSC transplantation is promising biotechnology to improve livestock production in the near future. This review will describe the origins of the SSC, identification, and characterization of SSC, *in vitro* culture of SSC, and the application of SSC transplantation for genetic quality of livestock improvement.

Key words: Spermatogonial stem cell, livestock genetic improvement, transplantation

ABSTRAK

Stem cell atau sel punca merupakan sel yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel dengan fungsi tertentu dan dapat memperbaharui diri untuk menghasilkan sel punca yang baru. Salah satu jenis sel punca yang aktif diteliti yaitu sel punca spermatogonia. Sel punca ini merupakan sel unipotent yang berkembang menjadi spermatozoa di dalam testis mamalia. Sel punca spermatogonia dapat ditransplantasikan ke testis pejantan resipien untuk meningkatkan mutu genetik ternak dan mempercepat perkembangbiakannya. Teknik transplantasi sel punca spermatogonia dimulai proses isolasi dari testis hewan donor, kultur secara *in vitro*, persiapan pejantan resipien, dan transplantasi sel punca spermatogonia ke pejantan resipien sehingga menghasilkan spermatozoa dewasa yang dapat membuahi sel telur. Berdasarkan hasil penelitian, teknologi transplantasi sel punca spermatogonia sudah berhasil diterapkan pada hewan besar seperti sapi, kambing, domba, babi, dan hewan mamalia yang lain seperti monyet. Transplantasi sel punca spermatogonia merupakan bioteknologi yang menjanjikan untuk meningkatkan produksi ternak dimasa yang akan datang. Review ini akan menguraikan asal-usul sel punca spermatogonia, identifikasi dan karakterisasi sel punca spermatogonia, kultur sel punca spermatogonia secara *in vitro* serta aplikasi transplantasi sel punca spermatogonia dalam upaya untuk meningkatkan mutu genetik ternak.

Kata kunci: Sel punca spermatogonia, mutu genetik ternak, transplantasi

PENDAHULUAN

Istilah *stem cells* atau sel punca saat ini semakin populer diberitakan oleh media cetak maupun elektronik dan menjadi topik utama penelitian bidang ilmu biologi. Sel punca dalam dunia kedokteran dianggap sebagai harapan baru bagi penyembuhan penyakit-penyakit degeneratif atau penurunan fungsi sel tubuh (Jin 2017). Sel punca itu sendiri memiliki arti sel yang belum berdiferensiasi sehingga dapat berkembang menjadi berbagai jenis sel lain dalam

tubuh (Melton 2014). Sel punca memiliki dua kemampuan yaitu dapat berdiferensiasi menjadi sel lain yang memiliki fungsi tertentu (*potency*) dan dapat memperbaharui diri menghasilkan sel punca yang baru (Chatzeli & Simons 2020).

Berdasarkan potensi, sel punca digolongkan menjadi beberapa jenis, yaitu; 1) sel punca *totipotent* yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel meliputi sel ekstraembrionik dan embrio, contohnya zigot; 2) sel punca *pluripotent* yang dapat berkembang menjadi hampir seluruh sel spesifik dalam tubuh,

namun tidak dapat berkembang menjadi individu baru, contohnya sel punca embrionik; 3) sel punca *multipotent* yang dapat berkembang menjadi beberapa jenis sel dewasa yang masih satu tipe, contohnya sel punca neural; 4) sel punca *unipotent* yang memiliki kemampuan berdiferensiasi terbatas, sehingga hanya dapat berkembang menjadi satu jenis sel saja, contohnya sel punca spermatogonia.

Sejalan dengan pesatnya perkembangan penelitian di bidang sel punca, satu-persatu fungsi dan karakteristik sel punca mulai terdefiniskan. Salah satu jenis sel punca yang belakangan ini aktif diteliti yaitu sel punca spermatogonia. Pertama kali diteliti, sel punca ini dilaporkan hanya merupakan sel punca dewasa yang hanya dapat menghasilkan spermatogonia yang berkembang menjadi sperma dewasa. Namun, selama dekade terakhir dilaporkan bahwa sel punca spermatogonia dapat berkembang menjadi sel *multipotent* (Im et al. 2012) atau bahkan *pluripotent* (Kanatsu-Shinohara & Shinohara 2013) ketika dikultur secara *in vitro* pada kondisi yang memadai. Oleh karena itu, sel punca spermatogonia memiliki potensi yang cukup besar untuk digunakan sebagai alternatif sumber sel *pluripotent* atau *multipotent* (Aponte 2015). Sel punca spermatogonia menjadi teknologi masa depan yang dapat digunakan untuk pengobatan penyakit degeneratif (Chen et al. 2020), meningkatkan kualitas mutu genetik ternak (Zheng et al. 2014), dan juga penyelamatan spesies-spesies yang hampir punah. Tulisan ini akan menguraikan pemanfaatan transplantasi sel punca spermatogonia guna meningkatkan mutu genetik ternak khususnya ruminansia dimulai dari proses identifikasi dan karakterisasi sel punca spermatogonia hingga prosedur transplantasi ke dalam pejantan resipien.

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI SEL PUNCA SPERMATOGONIA PADA TERNAK

Spermatozoa merupakan produk akhir dari proses spermatogenesis. Sebelum proses spermatogenesis dimulai mekanisme pembentukan sel germinal jantan pada mamalia sudah dimulai sejak sebelum lahir. Pada fase embrionik, sel germinal yang disebut PGCs (*Primordial Germ Cells*) terbentuk. Pada mamalia jantan PGCs berkembang menjadi gonosit (Sahare et al. 2018). Gonosit akan bermigrasi ke arah kompartemen bagian bawah dari *tubulus seminiferous* segera setelah hewan mamalia lahir dan berkembang menjadi sel punca spermatogonia (Cheon et al. 2020). Sel punca spermatogonia akan terus ada di dalam testis sepanjang hidup mamalia jantan dan akan berdiferensiasi secara terus-menerus menjadi spermatogonia serta memperbaharui diri untuk menghasilkan sel punca baru.

Karakteristik, aktivitas memperbaharui diri, dan diferensiasi pada sel punca spermatogonia bervariasi antar spesies. Sebelum dapat diperbanyak secara *in vitro*, sel punca spermatogonia harus dapat diidentifikasi dan dikarakterisasi terlebih dahulu. Identifikasi sel punca spermatogonia dilakukan dengan dua cara, pertama berdasarkan morfologinya dan yang kedua berdasarkan ekspresi penanda biomolekulernya. Berdasarkan morfologinya, sel spermatogonia pada hewan model seperti tikus dibedakan menjadi spermatogonia tipe A yang belum terdiferensiasi dan spermatogonia tipe B yang sudah terdiferensiasi. Spermatogonia tipe A terdiri dari spermatogonia *A_{single}*, *A_{pair}*, dan *A_{aligned}* (La et al. 2018). Menurut Kubota & Brinster (2018), yang termasuk kategori sel punca spermatogonia adalah spermatogonia tipe *A_{single}*. Sedangkan spermatogonia *A_{pair}* dan *A_{aligned}* merupakan sel *progenitor* dari sel punca spermatogonia. Berdasarkan penelitian terbaru sel *progenitor* tersebut beberapa diantaranya juga memiliki sifat seperti sel punca (Takase & Nusse 2016).

Pada hewan ternak, morfologi sel punca spermatogonia belum diketahui secara lebih rinci seperti pada tikus, sehingga karakterisasi sel punca spermatogonia pada hewan ternak lebih sulit. Sel punca spermatogonia pada hewan ternak dapat dikenali dengan menggunakan menggunakan penanda molekuler dan pemeriksaan histologis pada testis untuk mengetahui letaknya. Sel punca spermatogonia terletak di kompartemen basal dari *tubulus seminiferous* (Kubota & Brinster 2018) Berdasarkan penanda molekuler, ada berbagai macam gen yang sudah dikarakterisasi sebagai penanda sel punca spermatogonia, beberapa diantaranya yaitu *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) yang merupakan gen penanda sel punca spermatogonia pada sapi (Fujihara et al. 2011), babi (Almunia et al. 2018), dan kerbau (Feng et al. 2016); *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1* (UCHL-1) yang merupakan gen penanda sel punca spermatogonia pada sapi (Fujihara et al. 2011), kerbau (Yu et al. 2014) dan kambing (Heidari et al. 2012); *GDNF family receptor alpha-1* (GFR α -1) yang merupakan gen penanda sel punca spermatogonia pada babi (Lee et al. 2013), sapi (Giasseti et al. 2016) dan kuda (Costa et al. 2012); *THYmocyte differentiation antigen 1* (Thy-1) yang merupakan gen penanda sel punca spermatogonia pada kambing (Wu et al. 2013) dan sapi (Lei et al. 2017).

ISOLASI SEL PUNCA SPERMATOGONIA PADA TERNAK

Populasi sel punca spermatogonia di dalam testis hewan jantan sangat terbatas dan tercampur diantara sel-sel spermatogonia yang sedang mengalami proses diferensiasi dan yang sudah berdiferensiasi. Pada testis

tikus dewasa terdapat sekitar 35.000 sel spermatogonia *A_{single}* yang biasa dikategorikan sebagai sel punca spermatogonia (La et al. 2018), sedangkan pada hewan besar termasuk ternak belum diketahui secara pasti berapa jumlah sel punca spermatogonia di dalam testis.

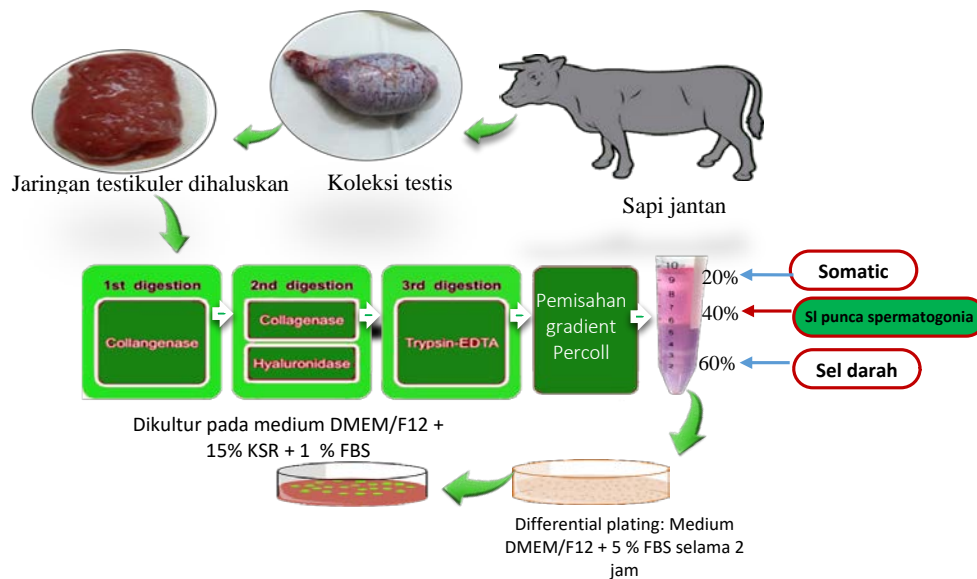
Sel punca spermatogonia harus dapat diisolasi dan dipisahkan dari sel-sel turunannya agar dapat dipelajari dan dimanfaatkan lebih lanjut. Proses isolasi sel punca spermatogonia ini dilakukan dengan menggunakan bantuan enzim yang mampu menguraikan sel-sel yang berada di sekitar sel punca spermatogonia di dalam testis. Sedangkan proses pemisahan sel punca spermatogonia dari sel somatik dan sel-sel turunannya dapat dilakukan dengan dua cara, yang pertama dengan cara mekanis berdasarkan morfologinya meliputi pemisahan *gradient Percoll* (Suyatno et al. 2018) dan *differential plating* (Fujihara et al. 2011), yang kedua menggunakan penanda genetik dengan memanfaatkan alat pemisahan sel (Sutermaster & Darling 2019).

Pemisahan dengan *gradient Percoll* dilakukan dengan menggunakan larutan Percoll dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 20%, 40%, dan 60% (Suyatno et al. 2018). Setelah melalui proses sentrifugasi, sel punca spermatogonia akan berada pada konsentrasi 20%, sementara sel-sel lain seperti sel somatik dan sel-sel spermatogonia yang sudah berdiferensiasi akan berada di lapisan Percoll dengan konsentrasi lebih tinggi (Gambar 1). Hal ini karena sel-sel punca spermatogonia memiliki ukuran lebih kecil sehingga akan berada pada larutan Percoll dengan konsentrasi yang lebih rendah ketika disentrifugasi.

Pemisahan sel punca spermatogonia menggunakan *differential plating* memanfaatkan sifat fisik dari sel punca spermatogonia dan sel-sel somatik penyusun

testis. Pada kultur sel biasanya dilakukan pelapisan terlebih dahulu pada cawan petri menggunakan gelatin atau senyawa yang merupakan bagian dari matriks ekstraseluler sel yang dikultur. Sel somatik penyusun testis jika dikultur biasanya akan segera melekat pada cawan petri yang sudah dilapisi gelatin, sedangkan sel punca spermatogonia membutuhkan waktu lebih lama untuk melekat dibandingkan sel somatik. Berdasarkan mekanisme tersebut, maka untuk memisahkan sel punca spermatogonia dari sel somatik dilakukanlah *differential plating*, dengan cara melakukan kultur selama beberapa jam sel-sel testis yang sudah diisolasi, kemudian sel somatik akan melekat pada cawan petri dan sel punca spermatogonia tetap berada dalam medium.

Cara pemisahan sel punca spermatogonia yang selanjutnya yaitu menggunakan alat pemisah sel dengan memanfaatkan penanda genetik yang sudah diketahui. Teknik pemisahan yang dimaksud diantaranya dengan menggunakan metode *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) (Goissis et al., 2018) dan *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) (Valli et al. 2014). Metode pemisahan sel punca spermatogonia tersebut lebih akurat karena dapat memperoleh sel punca spermatogonia yang lebih seragam. Metode ini sangat sulit diterapkan pada ternak untuk memisahkan sel punca spermatogonia karena disamping memerlukan peralatan yang mahal juga belum banyak penanda genetik sel punca spermatogonia pada ternak yang sudah diketahui. Proses pemisahan sel punca spermatogonia dengan alat *sorting* sel ini lebih banyak digunakan pada hewan model seperti tikus.



Gambar 1. Proses isolasi sel punca spermatogonia pada sapi

Sumber: Suyatno (2018)

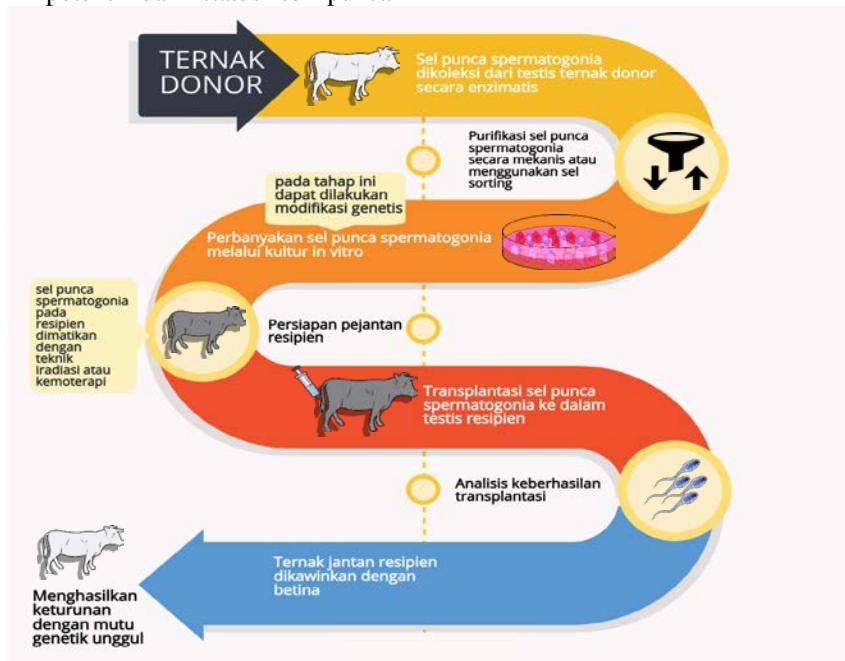
KULTUR *IN VITRO* DAN TRANSPLANTASI SEL PUNCA SPERMATOGONIA PADA TERNAK BESAR

Keterbatasan jumlah sel punca spermatogonia di dalam testis mendorong peneliti untuk memperbanyak jumlah sel punca spermatogonia secara *in vitro* agar dapat dimanfaatkan dan dipelajari secara lebih mendalam. Selama dasawarsa terakhir, sudah ada beberapa laporan mengenai keberhasilan kultur sel punca spermatogonia pada berbagai hewan ternak seperti pada sapi (Sahare et al. 2015), kambing (Heidari et al. 2012), kerbau (Sharma et al. 2019) babi (Zhang et al. 2017) namun sebagian besar sel punca spermatogonia ini terkontaminasi dengan sel spermatogonia yang sudah berdiferensiasi. Selain itu, sel spermatogonia yang dapat dikultur hanya yang berasal dari ternak usia muda (*pre-pubertal*). Suyatno et al. (2018) melaporkan terdapat perbedaan karakteristik dari sel punca spermatogonia dari sapi dewasa dan muda ketika dikultur secara *in vitro*. Umumnya, ternak muda memiliki populasi sel spermatogonia yang lebih seragam dibanding ternak dewasa, sehingga sel punca spermatogonia lebih mudah diisolasi dan dikultur. Pada ternak dewasa populasi spermatogonia di testis sangat beragam, sehingga perlu mengombinasikan beberapa teknik ketika ingin mengisolasi sel punca spermatogonia (Suyatno et al. 2018).

Sel punca spermatogonia ternyata memiliki potensi yang besar untuk diubah menjadi bentuk sel punca lain melebihi potensi dari status sel punca

spermatogonia sebagai sel kelamin. Sel punca spermatogonia pada tikus dapat menjadi bersifat *pluripotent* mirip seperti sel punca embrio (Kanatsu-Shinohara & Shinohara 2013). Analisis epigenetik menunjukkan bahwa sel punca spermatogonia memiliki sifat plastisitas, artinya dalam kondisi yang sesuai dapat berubah menjadi sel *pluripotent* atau *multipotent* (Chen et al. 2015); (Liu et al. 2016). Karena sifat plastisitas ini maka sel *pluripotent* juga dapat dikonversi menjadi sel punca spermatogonia dan menghasilkan sperma normal yang dapat membuahi (Ishikura et al. 2016). Sel punca spermatogonia pada sapi umur 3 bulan setelah dikultur juga dapat menyatu dengan *Inner Cell Mass* (ICM) pada embrio (Suyatno et al. 2018). Hal ini menunjukkan bahwa sel punca spermatogonia sapi juga memiliki potensi untuk dikonversi menjadi sel *pluripotent*.

Transplantasi sel punca spermatogonia pertama kali dilakukan pada tikus untuk mengetahui proses perkembangan sel germinal pada mamalia jantan hingga berlangsungnya proses spermatogenesis (Brinster & Zimmermann 1994); (Kanatsu-Shinohara et al. 2016) atau untuk memproduksi hewan transgenik (Li et al. 2016, Hamra et al. 2017). Setelah beberapa tahun transplantasi sel punca spermatogonia pada tikus berkembang, mulai dilakukan transplantasi sel punca spermatogonia pada mamalia besar seperti domba (Herrid et al. 2009), sapi (Hill & Dobrinski 2005), babi (Zeng et al. 2013), anjing (Harkey et al. 2013), kera (Hermann et al. 2012), dan kambing (Cicarelli et al. 2020).



Gambar 2. Alur proses transplantasi sel punca spermatogonia pada ternak.

Ada dua teknik transplantasi sel punca spermatogonia pada hewan ternak yaitu dengan transplantasi langsung ke dalam testis resipien dan dengan teknik *xenografting*. Ketika ditransplantasikan langsung ke dalam testis hewan resipien, hanya transplantasi alogenis (spesies yang sama) yang dapat menghasilkan spermatozoa normal sampai menghasilkan keturunan normal pada kambing (Honaramooz et al. 2003), domba (Herrid et al. 2009), dan kerbau (Sharma et al. 2020).

Teknik *xenografting* adalah teknik transplantasi sel atau jaringan dari satu spesies ke spesies lain. Teknik *xenografting* sel punca spermatogonia pada ternak pertama kali dikembangkan oleh Honaramooz et al. (2002) yang mentransplantasikan jaringan testis babi yang baru lahir ke tikus yang sudah dihilangkan sistem kekebalannya (tikus imunodefisiensi) dan dapat menghasilkan sperma normal. Selanjutnya keberhasilan teknik *xenografting* dapat diaplikasikan ke ternak-ternak lain seperti pada sapi, kambing, dan babi (Aponte 2015).

Teknik transplantasi sel punca spermatogonia dimulai dari proses isolasi dari testis hewan donor dengan menggunakan bantuan enzim. Kemudian sel punca spermatogonia diseleksi dan dikultur secara *in vitro* untuk memperbanyak jumlah atau melakukan modifikasi secara genetik jika diperlukan. Sementara itu, ternak jantan resipien disiapkan dengan terlebih dahulu mematikan sel punca spermatogonia pada testis yang ada ditestisnya dengan menggunakan teknik iradiasi atau terapi kimia. Selanjutnya sel punca spermatogonia ditransplantasikan ke hewan jantan resipien sehingga menghasilkan spermatozoa dewasa yang dapat membuahi sel telur (Gambar 2).

PROSPEK PEMANFAATAN SEL PUNCA SPERMATOGONIA

Perkembangan penelitian sel punca memberikan kemajuan pesat dalam bidang kedokteran, biologi perkembangan, dan bioteknologi reproduksi. Transplantasi sel punca spermatogonia dapat dijadikan metode alternatif dalam menyebarkan ternak unggul selain teknologi Inseminasi Buatan (Giassetti et al. 2019). Sel punca spermatogonia dari pejantan unggul dapat dikultur dan diperbanyak dalam jumlah besar sebelum ditransplantasikan ke pejantan resipien. Teknologi ini dapat memberikan peluang untuk menghemat penggunaan pejantan unggul. Selain mempercepat penyebaran proses penyebaran ternak-ternak unggul, sel punca juga memberikan peluang untuk menciptakan ternak unggul baru dengan metode manipulasi genetik untuk menghasilkan hewan transgenik. Salah satu teknik manipulasi genetik yang paling mudah dan populer dewasa ini adalah metode CRISPR/Cas9. Metode ini memungkinkan peneliti

untuk menyisipkan atau menghapus DNA tertentu secara lebih mudah dan tepat (Zhang et al. 2014), contohnya hasil penelitian genom tupai yang berhasil diedit menggunakan metode CRISPR/Cas9 dengan memanfaatkan kultur dan transplantasi sel punca spermatogonia (Li et al. 2016). Meskipun sebagian besar penelitian pengeditan gen dilakukan pada hewan model, tidak menutup kemungkinan di masa yang akan datang akan diterapkan kepada hewan besar.

Teknologi isolasi dan kultur sel punca spermatogonia secara *in vitro* juga dapat dimanfaatkan untuk konservasi sumber daya genetik. Spesies hewan yang hampir punah dan ternak unggul yang jumlahnya terbatas dapat diisolasi sel puncanya untuk selanjutnya dikultur secara *in vitro* agar dapat diperbanyak. Baik sel punca spermatogonia yang baru diisolasi maupun yang sudah dikultur dapat disimpan secara beku dalam waktu yang cukup lama tanpa mengalami kerusakan yang berarti (Oatley 2017). Hal ini memungkinkan pemanfaatan sel punca spermatogonia di masa yang akan datang untuk mencegah kepunahan spesies.

PROSPEK PEMANFAATAN SEL PUNCA SPERMATOGONIA UNTUK MENINGKATKAN MUTU GENETIK TERNAK DI INDONESIA

Berdasarkan perspektif bioteknologi pertanian modern, sel punca spermatogonia dapat menjadi bioteknologi reproduksi dan pemuliaan ternak generasi berikutnya yang penting dalam meningkatkan mutu genetik ternak. Transplantasi sel punca spermatogonia pada hewan besar saat ini belum efisien dan banyak detail teknis yang masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Namun demikian untuk menunjang akselerasi peningkatan produksi ternak di Indonesia dimana salah satunya dengan meningkatkan mutu genetik ternak lokal, maka lompatan penerapan bioteknologi reproduksi diperlukan.

Aplikasi sel punca spermatogonia dapat dengan cepat menyebarkan material genetik ternak-ternak unggul. Sebagai contoh, pemerintah melalui Kementerian Pertanian berupaya untuk meningkatkan mutu genetik ternak lokal dengan mendatangkan sapi Belgian Blue yang memiliki karakteristik perototan ganda (Agung et al. 2016). Upaya penyebarluasan sapi Belgian Blue dilakukan melalui metode Inseminasi Buatan (IB) dan Transfer Embrio (TE). Kedua teknologi reproduksi ini memang secara nyata sudah berkontribusi terhadap peningkatan populasi ternak di Indonesia. Namun demikian, dalam hal sapi Belgian Blue terdapat beberapa kendala, seperti jika disebarkan menggunakan IB, spermatozoa mengalami cekaman panas yang dapat menurunkan fertilitas (Residiwati et al. 2020). Sedangkan jika menggunakan TE, proses kelahiran pedet harus menggunakan operasi Caesar yang memerlukan biaya besar. Oleh karena itu,

transplantasi sel punca spermatogonia pada jantan sapi-sapi yang sudah beradaptasi di Indonesia dapat menjadi upaya alternatif untuk menyebarkan sapi Belgian Blue secara masif.

Selain sebagai upaya peningkatan mutu genetik ternak, penggunaan sel punca spermatogonia juga dapat untuk menyelamatkan spesies-spesies yang hampir punah. Sel punca spermatogonia dapat ditransplantasikan antar hewan ataupun disimpan dalam waktu yang cukup lama dengan teknologi kriopreservasi. Teknologi sel punca dan kultur sel pada era pertanian 4.0 menjadi salah satu teknologi yang menjanjikan untuk meningkatkan produksi daging asal ternak tanpa kehilangan plasma nutfah.

KESIMPULAN

Sel punca spermatogonia dapat dimanfaatkan dalam dunia peternakan melalui teknologi transplantasi. Pemanfaatan sel punca spermatogonia dari pejantan unggul melalui proses isolasi, identifikasi, kultur secara *in vitro* dan ditransplantasikan ke pejantan resipien secara masal hingga pejantan dapat menghasilkan sperma normal yang mampu membuahi sel telur. Transplantasi sel punca spermatogonia sudah diterapkan pada ternak seperti sapi, kambing, domba, dan babi. Teknologi ini memberikan alternatif lain dalam upaya meningkatkan mutu genetik ternak dan dan penyebarluasan genetik ternak-ternak unggul dengan jumlah pejantan yang terbatas. Transplantasi sel punca spermatogonia di masa yang akan datang dapat menjadi teknologi unggulan alternatif dalam industri perbibitan ternak khususnya dengan adanya era pertanian 4.0 yang memanfaatkan sumber daya yang terbatas.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Prof. (Riset). Dr. Ir. Elna Karmawati, MS dan Dr. Ir. Bachtar Bakrie, M.Sc. atas bimbingan dan kontribusinya dalam penyempurnaan tulisan ini. Review ini dibiayai dari pinjaman *International Bank for Reconstruction and Development (IBRD)* untuk membiayai *Sustainable Management of Agricultural Research and Technology Dissemination (SMARTD) Project*.

DAFTAR PUSTAKA

Agung PP, Said S, Sudiro A. 2016. Myostatin gene analysis in the first generation of the Belgian Blue cattle in Indonesia. *J Indones Trop Anim Agric*. 41:13–20. doi: 10.14710/jitaa.41.1.13-20.

Almunia J, Nakamura K, Murakami M, Takashima S, Takasu M. 2018. Characterization of domestic pig

spermatogenesis using spermatogonial stem cell markers in the early months of life. *Theriogenology*, 107:154–161. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.041.

- Aponte PM. 2015. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 7:669. doi: 10.4252/wjsc.v7.i4.669.
- Brinster RL, Zimmermann JW. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:11298–11302.
- Chatzeli L, Simons BD. 2020. Tracing the dynamics of stem cell fate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 12:a036202. doi: 10.1101/cshperspect.a036202.
- Chen Z, Hong F, Wang Z, Hao D, Yang H. 2020. Spermatogonial stem cells are a promising and pluripotent cell source for regenerative medicine. *Am J Transl Res*. 12:7048–7059.
- Chen Z, Li Z, He Z. 2015. Plasticity of male germline stem cells and their applications in reproductive and regenerative medicine. *Asian J Androl*. 17:367–372. doi: 10.4103/1008-682X.143739.
- Cheon YP, Choi D, Lee SH, Kim CG. 2020. YY1 and CP2c in unidirectional spermatogenesis and stemness. *Develop Reprod*. 24:249–262. doi: 10.12717/DR.2020.24.4.249.
- Ciccarelli M, Giassetti MI, Miao D, Oatley MJ, Robbins C, Lopez-Biladeau B, Waqas MS, Tibary A, Whitelaw B, Lillo S, Park CH, Park KE, Telugu B, Fan Z, Liu Y, Regouski M, Polejaeva IA, Oatley JM. 2020. Donor-derived spermatogenesis following stem cell transplantation in sterile NANOS2 knockout males. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 117:24195–24204. doi: 10.1073/pnas.2010102117.
- Costa GMJ, Avelar GF, Rezende-Neto JV, Campos-Junior P HA, Lacerda SMSN, Andrade BSC, Thomé RG, Hofmann MC, Franca LR. 2012. Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PLOS ONE*. 7:e44091. doi: 10.1371/journal.pone.0044091
- Feng W, Chen S, Do D, Liu Q, Deng Y, Lei X, Luo C, Huang B, Shi D. 2016. Isolation and identification of prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonial stem cells. *Asian-Australas J Anim Sci*. 29:1407–1415. doi: 10.5713/ajas.15.0592.
- Fujihara M, Kim SM, Minami N, Yamada M, Imai H. 2011. Characterization and *in vitro* culture of male germ cells from developing bovine testis. *J Reprod Develop*. 57:355–364.
- Giassetti MI, Ciccarelli M, Oatley JM. 2019. Spermatogonial stem cell transplantation: Insights and outlook for domestic animals. *Ann Rev Anim Biosci*. 7:385–401. doi: 10.1146/annurev-animal-020518-115239.
- Giassetti MI, Goissis MD, Moreira PV, de Barros FRO, Assumpção MEOD, Visintin JA. 2016. Effect of age

- on expression of spermatogonial markers in bovine testis and isolated cells. *Anim Reprod Sci.* 170:68–74. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.04.004.
- Goissis MD, Giassetto MI, Worst RA, Mendes CM, Moreira PV, Assumpção MEOA, Visintin JA. 2018. Spermatogonial stem cell potential of CXCR4-positive cells from prepubertal bull testes. *Anim Reprod Sci.* 196:219–229. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.08.014.
- Hamra FK, Richie CT, Harvey BK. 2017. Long Evans rat spermatogonial lines are effective germline vectors for transgenic rat production. *Transgenic Res.* 26:477–489. doi: 10.1007/s11248-017-0025-2.
- Harkey MA, Asano A, Zoulas ME, Torok-Storb B, Nagashima J, Travis A. 2013. Isolation, genetic manipulation, and transplantation of canine spermatogonial stem cells: Progress toward transgenesis through the male germ line. *Reproduction.* 146:10.1530/REP-13-0086. doi: 10.1530/REP-13-0086.
- Heidari B, Rahmati-Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani, AH, Jeddi-Tehrani M, Shirazi A, Naderi MM, Behzadi B. 2012. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. *J Assist Reprod Genet.* 29:1029–1038. doi: 10.1007/s10815-012-9828-5.
- Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G, Peterson K, Masterson K, Ramsey C, Ward T, Lienesch M, Volk A, Cooper DK, Thomson AW, Kiss JE, Orwig KE. 2012. Spermatogonial stem cell transplantation into Rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell.* 11:715–726. doi: 10.1016/j.stem.2012.07.017.
- Herrid M, Olejnik J, Jackson M, Suchowerska N, Stockwell S, Davey R, Hutton K, Hope S, Hill JR. 2009. Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biol Reprod.* 81:898–905. doi: 10.1095/biolreprod.109.078279.
- Hill JR, Dobrinski I. 2005. Male germ cell transplantation in livestock. *Reprod Fertil Develop.* 18:13–18. doi: 10.1071/RD05123.
- Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. 2003. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Develop.* 64:422–428. doi: 10.1002/mrd.10205.
- Im JE, Song SH, Kim JY, Kim KL, Baek SH, Lee DR, Suh W. 2012. Vascular differentiation of multipotent spermatogonial stem cells derived from neonatal mouse testis. *Experiment Mol Medic.* 44:303–309. doi: 10.3858/emmm.2012.44.4.034.
- Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta H, Hayashi K, Nakamura T, Okamoto I, Yamamoto T, Kurimoto K, Shirane K, Sasaki H, Saitou M. 2016. In vitro derivation and propagation of spermatogonial stem cell activity from mouse pluripotent stem cells. *Cell Reports.* 17:2789–2804. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.026.
- Jin J. 2017. Stem cell treatments. *JAMA.* 317:330. doi: 10.1001/jama.2016.17822.
- Kanatsu-Shinohara M, Naoki H, Shinohara T. 2016. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. *Develop Cell.* 38:248–261. doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.011.
- Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. 2013. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Ann Rev Cell Develop Biol.* 29:163–187. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122353.
- Kubota H, Brinster RL. 2018. Spermatogonial stem cells. *Biol Reprod.* 99:52–74. doi: 10.1093/biolre/i0y077.
- La HM, Mäkelä JA, Chan AL, Rossello FJ, Nefzger CM, Legrand JMD, De Seram M, Polo JM, Hobbs RM. 2018. Identification of dynamic undifferentiated cell states within the male germline. *Nat Commun.* 9:2819. doi: 10.1038/s41467-018-04827-z.
- Lee KH, Lee WY, Kim JH, Yoon MJ, Kim NH, Kim JH, Uhm SJ, Kim DH, Chung HJ, Song H. 2013. Characterization of GFR α -1-positive and GFR α -1-negative spermatogonia in neonatal pig testis. *Reprod Domest Anim Zuchthygiene.* 48:954–960. doi: 10.1111/rda.12193.
- Lei Q, Pan Q, Ma J, Zhou Z, Li G, Chen S, Hua J. 2017. Establishment and characterization of immortalized bovine male germline stem cell line. *J Integrative Agric.* 16:2547–2557. doi: 10.1016/S2095-3119(16)61625-8.
- Li CH, Yan LZ, Ban WZ, Tu Q, Wu Y, Wang L, Bi R, Ji S, Ma YH, Nie WH, Lv LB, Yao YG, Zhao XD, Zheng P. 2016. Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring. *Cell Res.* 27:241–252. doi: 10.1038/cr.2016.156.
- Liu Y, Giannopoulou EG, Wen D, Falciatori I, Elemento O, Allis CD, Rafii S, Seandel M. 2016. Epigenetic profiles signify cell fate plasticity in unipotent spermatogonial stem and progenitor cells. *Nat Commun.* 7:11275. doi: 10.1038/ncomms11275.
- Melton D. 2014. Chapter 2 ‘Stemness’: Definitions, criteria, and standards. In: *Essentials of stem cell biology.* 3rd ed. Academic Press. p. 7–17. doi: 10.1016/B978-0-12-409503-8.00002-0.
- Oatley J. 2017. Cryopreserving and thawing spermatogonial stem cells. *Cold Spring Harbor Protoc* 2017. doi: 10.1101/pdb.prot094219.
- Residiwati G, Tuska HSA, Budiono, Kawai GKV, Seifi-Jamadi A, Santoro D, Leemans B, Boccart C, Pascottini OB, Opsomer G, Van Soom A. 2020. Practical methods to assess the effects of heat stress on the quality of frozen-thawed Belgian Blue semen in field conditions. *Anim Reprod Sci.* 221:06572. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106572.

- Sahare M, Otomo A, Komatsu K, Minami N, Yamada M, Imai H. 2015. The role of signaling pathways on proliferation and self-renewal of cultured bovine primitive germ cells. *Reprod Med Biol.* 14:17–25. doi: 10.1007/s12522-014-0189-x.
- Sahare MG, Suyatno, Imai H. 2018. Recent advances of in vitro culture systems for spermatogonial stem cells in mammals. *Reprod Med Biol.* 17:134-142. doi: 10.1002/rmb2.12087.
- Sharma A, Kumaresan A, Mehta P, Nala N, Singh MK, Palta, P, Singla SK, Manik RS, Chauhan MS. 2020. Successful transplantation of transfected enriched buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonial stem cells to homologous recipients. *Theriogenology.* 142:441–449. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.10.019.
- Sharma A, Shah SM, Saini N, Mehta P, Kumar BSB, Dua D, Singh MK, Singla SK, Palta P, Manik RS, Chauhan MS. 2019. Optimization of serum-free culture conditions for propagation of putative buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonial stem cells. *Cell Reprogram.* 21:1–10. doi: 10.1089/cell.2018.0018.
- Sutermaster BA, Darling EM. 2019. Considerations for high-yield, high-throughput cell enrichment: Fluorescence versus magnetic sorting. *Scientific Reports.* 9:227. doi: 10.1038/s41598-018-36698-1.
- Suyatno, Kitamura Y, Ikeda S, Minami N, Yamada M, Imai H. 2018. Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes. *Molec Reprod Develop.* 85:236–249. doi: 10.1002/mrd.22958.
- Takase HM, Nusse R. 2016. Paracrine Wnt/ β -catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 113:E1489-1497. doi: 10.1073/pnas.1601461113.
- Valli H, Sukhwani M, Dovey SL, Peters KA, Donohue J, Castro CA, Chu T, Marshall GR, Orwig KE. 2014. Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. *Fertil Steril.* 102:566-580. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.036.
- Wu J, Song W, Zhu H, Niu Z, Mu H, Lei A, Yang C, Peng S, Li X, Li G, Hua J. 2013. Enrichment and characterization of Thy1-positive male germline stem cells (mGSCs) from dairy goat (*Capra hircus*) testis using magnetic microbeads. *Theriogenology.* 80:1052–1060. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.003.
- Yu X, Riaz H, Dong P, Chong Z, Luo X, Liang A, Yang L. 2014. Identification and IVC of spermatogonial stem cells in prepubertal buffaloes. *Theriogenology.* 81:1312–1322. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.03.002.
- Zeng W, Tang L, Bondareva A, Honaramooz A, Tanco V, Dores C, Megee S, Modelski M, Rodriguez-Sosa JR, Paczkowski M, Silva E, Wheeler M, Krisher RL, Dobrinski I. 2013. Viral Transduction of male germline stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod.* 88:27. doi: 10.1095/biolreprod.112.104422.
- Zhang F, Wen Y, Guo X. 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molec Gen.* 23:R40–R46. doi: 10.1093/hmg/ddu125.
- Zhang P, Chen X, Zheng Y, Zhu J, Qin Y, Lv Y, Zeng W. 2017. Long-term propagation of porcine undifferentiated spermatogonia. *Stem Cells Develop.* 26:1121–1131. doi: 10.1089/scd.2017.0018.
- Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. 2014. Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects. *Reprod.* 147:R65–R74. doi: 10.1530/REP-13-0466.