

Kultur Tiga Dimensi Testis Mencit (*Mus musculus*) dalam Berbagai Media: Kajian Morfologi

*(THREE-DIMENSIONAL CULTURE OF MOUSE
(MUS MUSCULUS) TESTES IN VARIOUS MEDIA:
A MORPHOLOGICAL STUDY)*

**Wahono Esthi Prasetyaningtyas^{1*},
Nelza Putri Yasmin², Ronald Tarigan³,
Kusdiantoro Mohamad¹, Mokhamad Fahrudin¹**

¹ Divisi Anatomi, Histologi dan Embriologi

² Program Sarjana Kedokteran Hewan

³ Divisi Fisiologi,

Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis,

IPB University,

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga,

Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

*Email: wahono_esti@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

Cell culture involves isolating cells from animal tissue and allowing them to grow in a controlled artificial environment. There are two main types of culture methods: two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D). This study was aimed to identify the most effective medium for 3D culture of testicular tissue. The media tested included Alpha Modified Eagle Medium (α MEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Knockout[®] Serum Replacement (KSR), and Fetal Bovine Serum (FBS). Small fragments of adult mouse testes were cultured in three different media combinations: α MEM with 10% FBS, α MEM with 10% KSR, and DMEM with 10% KSR, over periods of seven and 14 days at 35 °C in an atmosphere containing 5% carbon dioxide (CO₂). After cultivation, the tissues were processed for histological examination and stained using hematoxylin and eosin (HE). The results indicated that the number of spermatogonia cells was similar across all media on both days. However, on day seven, the number of primary spermatocytes was significantly higher in the α MEM + KSR 10% group compared to α MEM + FBS 10%, and also higher than in the DMEM + KSR 10% group. By day 14, no significant differences in primary spermatocyte counts were observed among the groups. Regarding spermatid cells, on day seven, DMEM + KSR 10% supported significantly higher cell numbers than the other two media. This trend continued on day 14, with DMEM + KSR 10% maintaining the highest number of spermatid cells. Overall, the DMEM + KSR 10% combination was found to be the most effective medium for supporting three-dimensional testicular tissue culture.

Keywords: cell culture; spermatogenesis; medium culture; Fetal Bovine Serum; KnockOut[®] Serum Replacement

ABSTRAK

Kultur sel merupakan proses isolasi sel dari jaringan hewan dan menumbuhkannya dalam lingkungan buatan yang terkontrol. Terdapat dua metode utama dalam kultur sel, yaitu kultur dua dimensi (2D) dan kultur tiga dimensi (3D). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi medium paling efektif untuk kultur jaringan testis secara tiga dimensi. Medium yang diuji meliputi *Alpha Modified Eagle Medium* (α MEM), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), *Knockout[®] Serum Replacement* (KSR), dan *Fetal Bovine Serum* (FBS). Potongan kecil testis mencit dewasa dikultur dalam tiga kombinasi media yang berbeda: α MEM dengan 10% FBS, α MEM dengan 10% KSR, dan DMEM dengan 10% KSR, selama tujuh dan 14 hari pada suhu 35 °C dalam atmosfer yang mengandung 5% karbon dioksida (CO₂). Setelah masa kultur, jaringan diproses untuk pemeriksaan histologis dan diwarnai menggunakan pewarnaan hematoksilin dan eosin (HE). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel spermatogonia relatif sama pada semua media baik pada hari ke-7 maupun hari ke-14. Namun, pada hari ke-7, jumlah spermatosit primer secara signifikan lebih tinggi pada kelompok α MEM + 10% KSR dibandingkan dengan α MEM + 10% FBS, dan juga lebih tinggi dibandingkan dengan DMEM + 10% KSR. Pada hari ke-14, tidak ditemukan perbedaan signifikan dalam jumlah spermatosit primer antar tiga kelompok. Mengenai sel spermatid, pada hari ke-7, DMEM + 10% KSR menghasilkan jumlah sel yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dua media lainnya. Pola ini berlanjut hingga hari ke-14, dan DMEM + 10% KSR tetap menunjukkan jumlah sel spermatid tertinggi. Secara keseluruhan, kombinasi media DMEM + 10% KSR ditemukan sebagai medium paling efektif untuk mendukung kultur jaringan testis secara tiga dimensi.

Kata-kata kunci: kultur sel; spermatogenesis; medium kultur; *Fetal Bovine Serum*; *KnockOut[®] Serum Replacement*

PENDAHULUAN

Kultur sel merupakan metode yang sangat fleksibel dan penting dalam menjawab berbagai pertanyaan penelitian, baik dalam sains dasar maupun terapan. Salah satu keunggulan utama dari penggunaan *cell line* dalam penelitian adalah kemampuannya menghasilkan data yang konsisten dan dapat direproduksi karena sifat homogen dari sel-sel tersebut (Segeritz dan Vallier, 2017). Kultur sel secara *in vitro* juga digunakan untuk memperbanyak sel (Prasetyaningtyas *et al.*, 2019), mempelajari faktor-faktor yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi serta yang berhubungan dengan kasus klinik. Dalam dunia biomedis, kultur sel sering dijadikan alternatif untuk menggantikan penggunaan hewan percobaan. Sel-sel dapat diambil dari jaringan normal atau jaringan yang mengalami gangguan, dan dikultur di luar tubuh menggunakan media buatan. Teknik ini banyak

digunakan untuk memahami struktur dan fungsi sel, mekanisme penyakit, respons terhadap obat, serta dalam bidang rekayasa jaringan (Freshney, 2005).

Kultur *in vitro* untuk sel dua dimensi (2D) telah banyak digunakan sebagai metode dasar. Namun, keandalannya dalam merepresentasikan kondisi biologis alami masih menjadi perdebatan, mengingat lingkungan kultur 2D berbeda dengan lingkungan *in vivo* yang kompleks. Kultur sel 2D umumnya hanya memungkinkan pertumbuhan sel pada permukaan datar, sehingga membatasi interaksi sel secara fisiologis (Habanjar *et al.*, 2021). Sebaliknya, kultur sel tiga dimensi (3D) menawarkan pendekatan yang lebih representatif dengan menciptakan lingkungan yang memungkinkan sel tumbuh dan berinteraksi dalam tiga arah. Model kultur 3D ini memberikan gambaran yang lebih realistis terhadap perilaku dan fungsi sel di

dalam tubuh, dibandingkan dengan susunan sel tipis dan datar pada sistem 2D. Oleh karena itu, penggunaan model 3D dianggap lebih relevan untuk studi biomedis yang menuntut kemiripan dengan kondisi *in vivo* (Edmondson *et al.*, 2014).

Medium yang digunakan dalam kultur sel biasanya adalah Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (DMEM) dan *Alfa Modified Eagle Medium* (α MEM) merupakan medium dasar untuk kultur sel (Patel *et al.*, 2018). Serum yang umumnya digunakan dalam membantu proses kultur sel adalah *Fetal Bovine Serum* (FBS). Serum ini dapat memicu pertumbuhan sel, namun tidak stabil antar *batch* sehingga dapat memengaruhi hasil penelitian (Brown *et al.*, 2020). *Fetal Bovine Serum* ini juga diketahui memiliki kandungan yang kompleks belum teridentifikasi dan xenogenik yang dapat memicu reaksi imunologis serta potensi penularan patogen, sehingga mendorong pengembangan serum lain (van der Valk *et al.*, 2018; Gstraunthaler, 2003). Sebagai pengganti serum FBS, *Knock-Out[®] Serum* (KSR) dirancang agar dapat memelihara 2 sel dalam jangka Panjang dan komposisinya sudah tetap (Zhang *et al.* 2016).

Testis adalah organ reproduksi jantan yang memiliki dua fungsi utama: (1) fungsi eksokrin, yaitu menghasilkan sel sperma (*spermatozoa*), dan (2) fungsi endokrin, yaitu memproduksi hormon testosteron. Proses pembentukan sperma atau spermatogenesis merupakan mekanisme biologis yang kompleks, mencakup pembelahan sel melalui mitosis dan meiosis serta tahap diferensiasi. Spermatogenesis dibagi menjadi dua fase utama: spermatositogenesis, yakni tahap perubahan spermatogonia menjadi spermatosit primer, kemudian sekunder hingga menjadi spermatid dan spermiogenesis, yaitu fase transformasi spermatid menjadi spermatozoa (Suede *et al.*, 2025). Gangguan pada sistem reproduksi merupakan masalah utama yang dihadapi oleh manusia maupun hewan. Untuk memahami lebih dalam dan mencari solusi terhadap gangguan tersebut, pemanfaatan model menjadi sangat penting termasuk kultur sel testis untuk melihat proses fisiologisnya (Prasetyaningtyas *et al.*, 2020). Penelitian ini

bertujuan mengetahui morfologi testis pascakultur tiga dimensi dalam medium yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dari bulan Oktober sampai Desember 2024. Penelitian dilakukan di Laboratorium Embriologi dan Laboratorium Layanan Pendidikan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis (SKHB) IPB untuk kultur tiga dimensi dan Laboratorium Histologi SKHB IPB untuk pembuatan preparat histologi.

Pembuatan Medium Kultur

Medium kultur tiga dimensi ini menggunakan medium α MEM ditambahkan dengan FBS 10% atau KSR 10% dan DMEM ditambahkan dengan KSR 10%, antibiotik gentamicin (Garasol[®], Merck, Darmstadt, Jerman) 50 μ g/mL dan antibiotik-antimikotik (Antibiotic-antimikotik[®], Sigma, Kawasaki, Jepang) 100 μ L dalam 100 μ L media sebagai bahan opsional untuk mencegah kontaminasi ketika kultur. Medium kultur dibuat menjadi tiga medium berbeda, yaitu α MEM+FBS 10%, α MEM+KSR 10%, serta DMEM+KSR 10%.

Pembuatan Gel Agarose

Gel agarosa yang digunakan dalam kultur 3D adalah agarosa konsentrasi 1,5%. Pembuatannya dengan cara melarutkan agarosa sebanyak 1,5 g dalam 100 mL Mili-Q, kemudian diautoclave dengan suhu 121°C. Dalam keadaan hangat, agarose 1,5% langsung dituangkan ke dalam cawan petri ukuran 150 mm, kemudian didiamkan dalam keadaan terbuka, selama 30 menit sampai memadat. Gel yang sudah memadat dipotong dengan ukuran 1x1 cm, lalu dipindahkan ke cawan petri kecil ukuran 30 mm. Setiap cawan terisi 3-4 potong gel. Medium ditambahkan ke cawan petri dengan ketinggian 3/4 gel kira-kira 2 mL, kemudian dipindahkan ke inkubator karbondioksida (CO₂) suhu 35°C, 24 jam.

Isolasi Testis

Testis diisolasi dari 8 mencit dewasa kurang lebih umur dua bulan. Penggunaan hewan coba telah disetujui oleh komisi etik SKHB No 050/KEH/SKS/XI/2022. Mencit dianestesi dengan menggunakan campuran ketamin xylazin (0,1 mg/kg BB im), kemudian mencit dikorbankan nyawanya dengan cara dekapitasi. Testis dikeluarkan dari skrotum dan dicuci dengan menggunakan Dulbecco's *Phosphate Buffer Saline* (DPBS, Servicebio, Wuhan Hubei, Tiongkok). Di bawah mikroskop, tunika vaginalis dan epididimis dipisahkan dari testis, lalu testis dipotong menjadi potongan kecil berukuran 1-2 x 1-2 mm menggunakan scalpel kemudian dikultur 3D.

Kultur Testis Tiga Dimensi

Testis yang telah dipotong kemudian dipindahkan ke atas gel, lalu diinkubasi di inkubator CO₂ 5% dengan suhu 35°C. Kultur testis tiga dimensi dilakukan selama tujuh dan 14 hari dengan pergantian medium setiap 2-3 hari sekali. Setelah tujuh dan 14 hari kultur potongan testis difiksasi menggunakan paraformaldehyde 4% sampai dilakukan pembuatan preparat histologi.

Pembuatan Preparat Histologi dari Testis Hasil Kultur

Testis yang telah dikultur difiksasi menggunakan paraformaldehyde 4% yang selanjutnya dilakukan pembuatan preparat menggunakan metode parafin dan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Pewarna hematoxylin memberikan warna biru pada inti sel (nukleus). Selain itu, pewarna eosin memiliki sifat asam yang memberikan afinitas terhadap sitoplasma. Pewarnaan HE dilakukan dengan melaksanakan proses deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan hematoxylin, dehidrasi, pewarnaan eosin, *clearing* dan *mounting*. Tahapan deparafinisasi dilakukan untuk menghilangkan parafin dari jaringan serta kaca objek untuk kemudian dilakukan proses pewarnaan. Tahapan ini penting dilakukan agar penyerapan warna dapat dilakukan secara maksimal (Kierman 1990).

Pengamatan histologi dilakukan dengan melihat perkembangan sel testis yang telah dikultur. Pengamatan dilakukan

menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40 kali. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel dalam 15 lapang pandang pada setiap jenis. Sel spermatogenik yang dihitung terdiri atas sel spermatogonia, sel spermatosit, dan sel spermatid dalam tubulus dari tiga ulangan kemudian dibandingkan hasil dari perkembangan sel yang dikultur pada tiga medium berbeda.

Analisis Data

Analisis data dan visualisasi data menggunakan software GraphPad Prism 8. Uji normalitas dilakukan menggunakan Kolmogorov-Smirnov *test*. Data yang terdistribusi normal, dianalisis dengan uji sidik ragam satu arah atau *One-way Analysis of Variance* dengan uji lanjut Tukey dengan Tingkat kepercayaan 95%. Data yang tidak terdistribusi normal dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur sel tiga dimensi dilakukan dengan menggunakan ekstraseluler matriks sebagai bantalan dalam kultur. Beragam jenis matriks 3D telah dikembangkan menggunakan berbagai bahan dengan variasi dalam hal porositas, ukuran pori, permeabilitas dan sifat mekanis, yang dirancang untuk meniru matriks ekstraseluler (ECM) *in vivo* dari jaringan tertentu. Bahan-bahan ini bisa berupa logam, keramik, kaca, polimer alami dan sintesis, serta material komposit. Polimer yang baik adalah yang memiliki kemampuan dalam mengatur adhesi dan penyebaran sel, serta adsorpsi protein, yang pada akhirnya memengaruhi perlekatan sel secara keseluruhan (Antoni *et al.*, 2015). Pada penelitian ini menggunakan agarosa, matriks agarosa pada kultur oosit 3D mampu menyediakan dasar yang lembut dan non adhesif serta mampu memper-tahankan morfologi sel, mendorong proliferasi sel, pembentukan lumen dan peme-liharaan selama 14 hari (Le *et al.*, 2024). Kultur testis 3D pada penelitian ini selama 14 hari

untuk mengkaji medium yang mendukung proliferasi maupun pemeliharaan sel, walaupun spermatogenesis terjadi 48-52 hari. Testis yang dikultur 3D memperlihatkan struktur yang sferoid selama periode perlakuan (Gambar 1).

Medium kultur berperan penting dalam menunjang kelangsungan hidup sel germinal dan proses spermatogenesis secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan tiga jenis medium berbeda, yaitu α MEM + FBS 10%, α MEM + KSR 10%, dan DMEM + KSR 10%. Pengamatan terhadap preparat histologis dari hasil kultur dilakukan dengan mengidentifikasi sel-sel spermatogenik berdasarkan ciri morfologisnya, lalu dilakukan perhitungan jumlahnya.

Morfologi testis setelah tujuh hari kultur pada berbagai jenis medium disajikan pada Gambar 2. Pada semua perlakuan struktur tubulus seminiferus masih tampak jelas, namun pada medium α MEM + FBS 10% terlihat adanya ruang atau rongga di dalam tubulus. Sementara itu, Gambar 3 menunjukkan hasil morfologi testis setelah 14 hari kultur. Pada medium α MEM + FBS 10% tampak adanya indikasi apoptosis, sedangkan medium yang mengandung KSR 10% menunjukkan struktur tubulus yang lebih terjaga dan kerapatan sel spermatogenik yang lebih tinggi.

Jenis sel yang dihitung meliputi spermatogonia, spermatosit primer dan spermatid. Spermatozoa tidak termasuk dalam perhitungan karena tidak ditemukan pada sayatan histologis. Data jumlah sel spermatogenik disajikan dalam bentuk grafik, dengan perhitungan sel spermatogonia ditampilkan pada Gambar 4. Hasil perhitungan spermatogonia pada hari ke-7 dan ke-14 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar tiga jenis medium kultur yang digunakan. Baik penambahan FBS maupun KSR tidak berpengaruh nyata terhadap tahap awal spermatogenesis.

Data perhitungan jumlah sel spermatosit primer ditampilkan pada Gambar 5. Pada hari ke-7, jumlah sel spermatosit primer pada medium α MEM + KSR 10% menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan

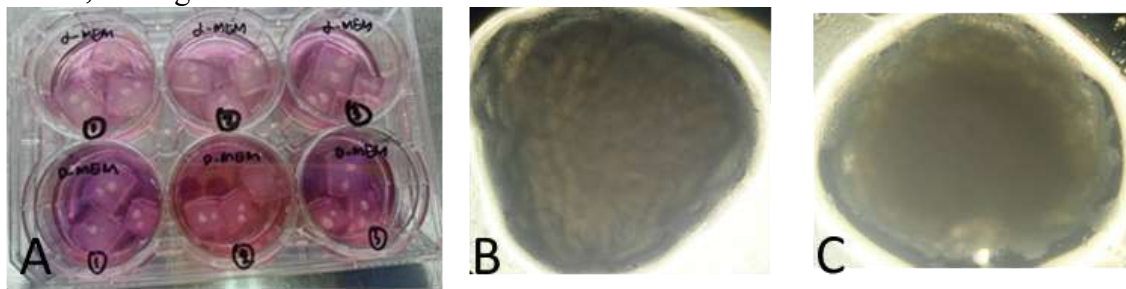
dengan medium α MEM + FBS 10%. Selain itu, jumlah sel pada medium α MEM + KSR 10% juga secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan medium DMEM + KSR 10%. Namun, pada hari ke-14, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan dalam jumlah sel spermatosit primer antar tiga jenis medium kultur. Proses transisi dari spermatogonia menjadi spermatosit primer memerlukan dukungan nutrisi dan hormonal yang optimal, yang dapat disediakan oleh α MEM yang kaya nutrisi (Jones *et al.*, 2019).

Perhitungan jumlah sel spermatid ditampilkan pada Gambar 6. Pada hari ke-7, terdapat perbedaan. Medium DMEM + KSR 10% menunjukkan jumlah sel spermatid yang lebih tinggi dibandingkan dengan medium α MEM + FBS 10% maupun α MEM + KSR 10%. Sementara itu, pada hari ke-14, medium DMEM + KSR 10% tetap menunjukkan jumlah sel spermatid yang secara signifikan lebih banyak dibandingkan dengan medium α MEM + FBS 10%, serta lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan medium α MEM + KSR 10%.

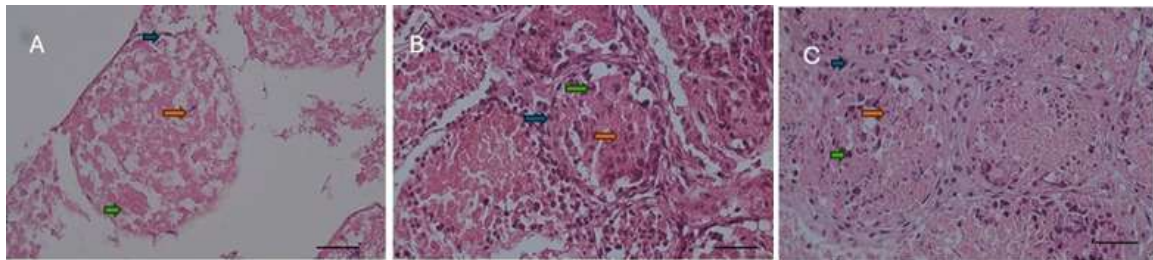
Kelompok dengan medium DMEM + KSR 10% menunjukkan perbedaan signifikan dibandingkan dua medium lainnya, baik pada hari ke-7 maupun ke-14. Kombinasi ini memberikan lingkungan kultur yang stabil serta mendukung diferensiasi sel hingga tahap akhir spermatogenesis. Medium ini terbukti mendukung pembentukan spermatid, terutama karena peran *KnockOut Serum Replacement* (KSR) yang bebas dari protein hewani dan mengandung lipid, vitamin, serta faktor pertumbuhan penting, sehingga mampu meningkatkan kualitas diferensiasi sel spermatogenik (Smith dan Johnson, 2020).

Jumlah spermatid lebih banyak ditemukan pada medium DMEM + KSR. Media dengan dasar DMEM memiliki kandungan nutrisi yang lebih kaya dibandingkan medium lainnya, termasuk glukosa dalam kadar tinggi sebagai sumber energi dan asam amino yang mendukung sintesis protein pada tahap meiosis dan diferensiasi

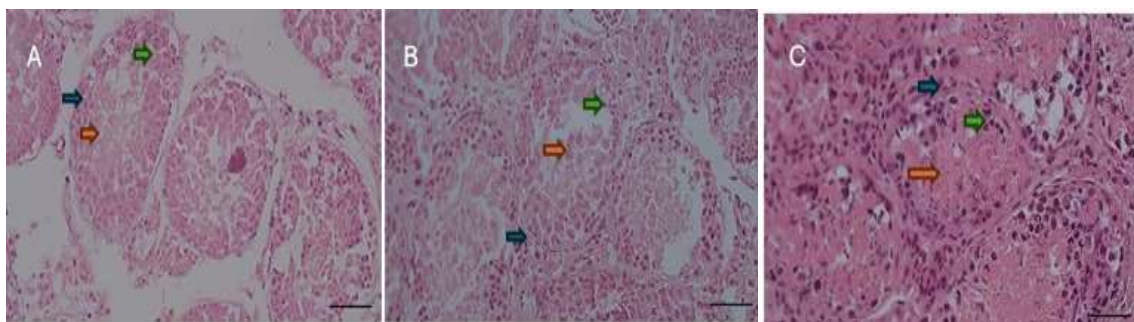
spermatid, sedangkan medium α MEM



Gambar 1. Kultur tiga dimensi organ testis dalam medium berbeda. A. kondisi kultur tiga dimensi; B. makroskopis kultur testis nol hari; C. makroskopis kultur testis tujuh hari



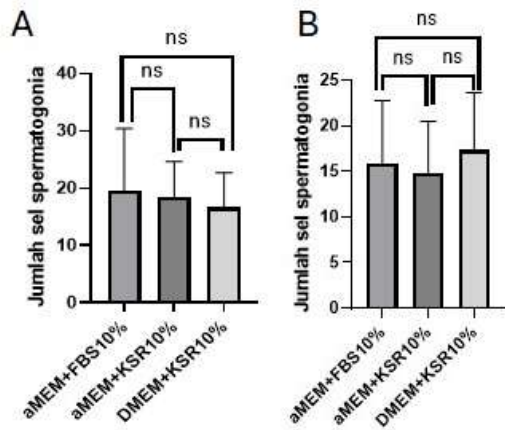
Gambar 2 Morfologi testis hasil kultur tiga dimensi selama 7 hari. Hasil kultur dengan medium α MEM+FBS 10% (A), medium α MEM+KSR 10% (B) dan medium DMEM+KSR 10% (C). Panah biru: sel spermatogonia; panah hijau: sel spermatosit primer; panah orange: sel spermatid. Pewarnaan HE. Bar= 10 μ m.



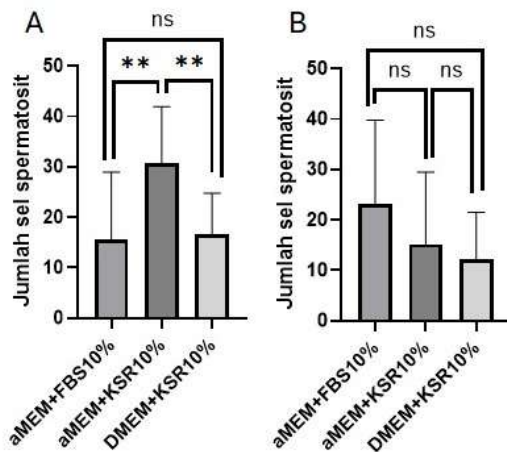
Gambar 3 Morfologi testis hasil kultur tiga dimensi selama 14 hari. Hasil kultur dengan medium α MEM+FBS 10% (A), medium α MEM+KSR 10% (B) dan medium DMEM+KSR 10% (C). Panah biru: sel spermatogonia; panah hijau: sel spermatosit primer; panah orange: sel spermatid. Pewarnaan HE. Bar= 10 μ m.

sendiri mengandung asam amino esensial, vitamin, dan glukosa dalam kadar tinggi, menciptakan lingkungan mikro yang mendukung perkembangan sel spermatogonik. Selain itu, pH dan osmolaritas α MEM cukup stabil untuk menjaga kultur sel germinal selama fase mitosis dan meiosis (Brown *et al.*, 2020). Glukosa dalam medium juga membantu menjaga metabolisme sel dalam kultur, sehingga mendukung perkembangan spermatid secara optimal (Guo *et al.*, 2018).

Selain itu, medium kultur juga memerlukan serum. Serum KSR diketahui bebas kontaminan dan zat toksik, sehingga mampu menciptakan lingkungan yang lebih stabil. Medium dengan penambahan KSR mampu mendukung perubahan spermatosit menjadi spermatid (Wei *et al.*, 2018).



Gambar 4. Perhitungan sel spermatogonia dari testis hasil kultur tiga dimensi selama 7 hari (A) dan 14 hari (B)

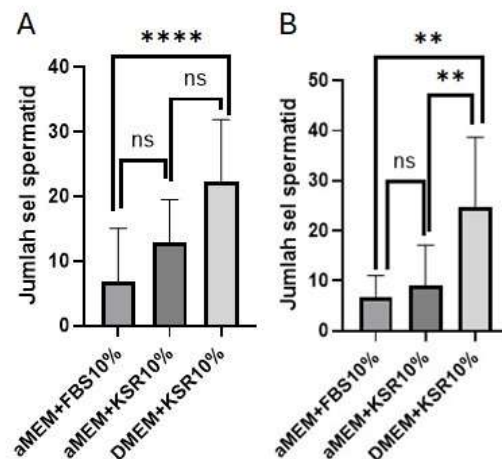


Gambar 5 Perhitungan sel spermatosit primer dari testis hasil kultur tiga dimensi selama 7 hari (A) dan 14 hari (B)

Medium DMEM + KSR 10% juga menjaga aktivitas metabolik sel sertoli yang berfungsi menyediakan nutrisi dan faktor pertumbuhan untuk sel germinal (Grootegeed *et al.*, 1995). Bahan KSR juga mengandung molekul bioaktif seperti lipid dan protein kompleks yang membantu perkembangan sel germinal secara alami (Smith dan Johnson, 2020). Baik FBS maupun KSR secara umum menyediakan lingkungan kultur yang kaya nutrisi dan mendukung pembelahan mitosis pada spermatogonia (Jones *et al.*, 2019).

Spermatozoa tidak ditemukan dalam tubulus seminiferus yang dikultur pada

ketiga medium, menunjukkan bahwa sperma-



Gambar 6. Perhitungan sel spermatid dari testis hasil kultur tiga dimensi selama 7 hari (A) dan 14 hari (B)

togenesis hanya berlangsung hingga tahap spermatid. Proses spermiogenesis memerlukan hormon testosteron yang biasanya diproduksi oleh sel Leydig dalam testis dan sangat penting untuk aktivitas sel sertoli serta diferensiasi spermatid menjadi spermatozoa. Studi sebelumnya menyarankan bahwa penambahan hormon testosteron ke medium dapat meningkatkan keberhasilan diferensiasi (Richer *et al.*, 2019). Medium DMEM dan αMEM tidak mengandung testosteron maupun faktor pertumbuhan penting seperti *Insulin-like Growth Factor* (IGF) dan *Glial celline-Derived Neurotrophic factor* (GDNF) yang mendukung perkembangan lebih lanjut menjadi spermatozoa (Durairajayagam *et al.*, 2015). Selain itu, spermatogenesis dan spermiogenesis pada mencit memerlukan waktu 48–52 hari, sedangkan kultur dalam penelitian ini hanya berlangsung selama 7–14 hari, yang belum cukup untuk memungkinkan terbentuknya spermatozoa (Grive dan Freiman, 2015).

Meskipun medium αMEM + KSR 10% mendukung pertumbuhan beberapa jenis sel, kekurangan faktor pertumbuhan tertentu serta perbedaan komposisi asam amino dapat menghambat diferensiasi sel germinal dan menyebabkan degenerasi (Wang dan Liu, 2021). Sementara itu,

medium α MEM + FBS 10% memang memberikan faktor pertumbuhan, tetapi kualitas FBS yang bervariasi antar *batch* dapat menurunkan stabilitas kultur dan memengaruhi integritas sel spermatogenik (Brown *et al.*, 2020). Secara keseluruhan, medium DMEM + KSR 10% terbukti paling optimal karena mampu menciptakan lingkungan kultur yang stabil serta mendukung perkembangan spermatid secara lebih baik.

SIMPULAN

Medium yang paling efektif untuk kultur testis tiga dimensi adalah kombinasi DMEM dengan 10% KSR, ditunjukkan dengan morfologi testis dan jumlah sel spermatogenik yang paling baik. Penambahan KSR dalam medium kultur menghasilkan perkembangan sel spermatid yang lebih optimal dibandingkan dengan penggunaan serum FBS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada Kemenristekdikti yang telah memberikan dana Penelitian Fundamental Reguler (PFR) tahun 2024 dengan nomor kontrak 22097/IT3.D10/PT.01.03/P/B/2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. 2015. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough *in Vivo*. *International Journal of Molecular Sciences* 16(3): 517-5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
- Brown H, Zhang Q, Li X. 2020. Influence of fetal bovine serum on 3D testicular culture models. *Journal of Experimental Cell Biology* 47(6): 1123–1130.
- Durairajanayagam D, Agarwal A, On C. 2015. Causes, effects, and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online* 30(1): 14–27. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.018
- Grive KJ, Freiman RN. 2015. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development* 142(15): 2554–2563
- Grootegeod JA, Siep M, Baarends WM. 1995. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 9(2): 249-268.
- Grootegeod JA, Siep M, Baarends WM. 1995. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 9(2): 249-268.
- Gstraunthaler G. 2003. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *Alternatives to Animal Experimentation (ALTEX)* 20(4): 275–281. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/875>
- Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. 2015. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough *in Vivo*. *International Journal of Molecular Sciences* 16(3): 5517-5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>.
- Brown H, Zhang Q, Li X. 2020. Influence of fetal bovine serum on 3D testicular culture models. *Journal of Experimental Cell Biology* 47(6): 1123–1130.
- Durairajanayagam D, Agarwal A, On C. 2015. Causes, effects, and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online* 30(1):14–27. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.018
- Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 12(4):207-18.doi: 10.1089/adt.2014.573.
- Freshney RI. 2005. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5th edition. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell.
- Grive KJ, Freiman RN. 2015. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development* 142(15): 2554–2563
- Grootegeod JA, Siep M, Baarends WM. 1995. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 9(2): 249-268.

- Gstraunthaler G. 2003. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *Alternatives to Animal Experimentation (ALTEX)* 20(4): 275–281. <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/875>
- Guo J, Tao SX, Wang Y. 2018. The role of culture media in supporting spermatogenic cell proliferation and differentiation. *Journal of Reproductive Biology* 15(2): 145-152.
- Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 2021. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences* 22(22):12200. <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>.
- Jones EF, White GH, Taylor KL. 2019. Oxidative stress and its impact on spermatogenesis *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 17(1): 45–53
- Kiernan J A. 1990. *Histological and histochemical methods: Theory and practice*. Oxford. Pergamon Press.
- Le BAM, Nguyen LBL, Lam DTP, Lam CT, Nguyen N-T, Nguyen VT, Bui H-T. 2024. Agarose-based 3D culture improved the developmental competence of oocyte-granulosa complex isolated from porcine preantral follicle. *Theriogenology* 223: 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.04.010>.
- Patel DM, Shah J, Srivastava AS. 2018. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells International* 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/9652598>.
- Prasetyaningtyas, WE, Karja NWK, Agung-priyono S, Fahrudin M. 2019. Tingkat Proliferasi Primordial Germ Cells secara *In Vitro* dalam Medium Kultur dengan Penambahan Leukemia Inhibitory Factor. *Jurnal Veteriner* 20(4): 526-533. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.4.526>
- Prasetyaningtyas, WE, Karja NWK, Agung-priyono S, Fahrudin M. 2020. of testicular cell development of 5-day-old mice in culture *in vitro*. *Animal Science Journal* 91(1): e13332. <https://doi.org/10.1111/asj.13332>
- Richer G, Baert Y, Goossens. 2019. In-vitro spermatogenesis through testis modeling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology* 2020(8): 879–891. doi:10.1111/andr.12741
- Segeritz C-P, Vallier. 2017. Cell Culture. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 151–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>.
- Smith J, Johnson R. 2020. Extracellular matrix impact on spermatogenesis in 3D culture. *Reproductive Biology and Endocrinology* 18(4): 45-52
- Suede SH, Malik A, Sapra A. 2025. Histology, Spermatogenesis. In *Stat Pearls*. St. Petersburg, Florida, Stat Pearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553142/>
- van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Svenningsen ÅF, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. 2018. Optimization of chemically defined cell culture media—Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology In Vitro*. 24(4): 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- Wang P, Liu F. 2021. Comparison of culture media for testicular tissue and spermatogenesis. *Journal of Cell Science* 50(4): 230–238
- Wei X, Zhu Q, Jiang J. 2018. The role of testicular cell types in spermatogenesis. *Reproductive Biology* 15(1): 14–21
- Zhang S, Liu Z, Su G, Wu H. 2016. Comparative analysis of knockOut® serum with fetal bovine serum for the *in vitro* long-term culture of human limbal epithelial cells. *Journal of Ophthalmology* 2016: 7304812.
- Zhuo JL, Li XC. 2012. Proximal Nephron NIH Public Access. *Compr Physiol* 3(3): 1079-1123.