

Ragam penelitian dan pengembangan isolasi dan kultur sel punca mesenkim dari berbagai sumber

Various research and development of isolation and culture of mesenchymal stem cells from several sources

ARIYANI NOVIANTARI[✉], KHARIRI

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Jl. Percetakan Negara No. 23, Jakarta Pusat 10560, Indonesia. Tel./fax.: +62-21-42881745, ✉email: ariyani.noviantari@kemkes.go.id

Manuskrip diterima: 20 Desember 2019. Revisi disetujui: 15 Juni 2020.

Abstrak. Noviantari A, Khariri. 2020. Ragam penelitian dan pengembangan isolasi dan kultur sel punca mesenkim dari berbagai sumber. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 6: 611-618*. Perkembangan teknologi dalam dunia kedokteran modern telah mengarah pada pendekatan regeneratif dengan memanfaatkan potensi besar yang dimiliki sel punca. Sel punca adalah sel yang mampu memperbanyak diri (*self renewal*), belum memiliki bentuk dan fungsi yang spesifik (*undifferentiated*) tetapi mampu berdiferensiasi menjadi sel lainnya. Sel punca mesenkim (SPM) bersifat multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel tetapi terbatas hanya satu golongan sel saja dan dapat mengekspresikan beberapa penanda spesifik. SPM dapat diisolasi dari berbagai sumber, yaitu dari sumsum tulang, jaringan lemak, pulpa gigi, *Wharton jelly*, darah tali pusat dan lain-lain. Tulisan ini menguraikan tentang penelitian dan pengembangan isolasi SPM dari berbagai sumber. Tinjauan ini merupakan review literatur melalui penelusuran pustaka yang menguraikan berbagai penelitian dan pengembangan isolasi dan kultur SPM, kriopreservasi atau simpan beku SPM, kemampuan diferensiasi SPM, sifat imunotoleran SPM, aplikasi SPM terhadap penyakit degeneratif, *homing* SPM, dan perkembangan terkini: kontroversi istilah SPM. Bahan yang digunakan sebagai bahan kajian adalah literatur yang dipublikasi dalam kurun waktu 2009-2019. Sel punca mesenkim (SPM) dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, adiposit, sel hepatik, neuron dan lain-lain. SPM dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti sumsum tulang, jaringan lemak, jaringan ekstra-fetus (*Wharton jelly* dan darah tali pusat), gigi dan kulit. SPM mempunyai potensi besar untuk terapi penyakit degeneratif dan menjadi sebuah terobosan besar pada bidang kedokteran modern. Penelitian sel punca semakin mengalami perkembangan, namun di sisi lain masih menjadi kontroversi karena dianggap kurang etis terutama yang bersumber dari sel punca embrionik.

Kata kunci: Isolasi, penelitian, pengembangan, sel punca mesenkim, terapi

Abstract. Noviantari A, Khariri. 2020. Various research and development of isolation and culture of mesenchymal stem cells from several sources. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 6: 611-618*. The development of technology in the world of modern medicine has led to a regenerative approach by utilizing the great potential of stem cells. Stem cells are cells that can multiply (*self-renewal*), do not yet have specific forms and functions (*undifferentiated*) but can differentiate into other cells. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are multipotent which can differentiate into various cell types but are limited to only one cell group and can express several specific markers. MSCs can be isolated from various sources: the bone marrow, fat tissue, dental pulp, Wharton jelly, cord blood, and others. This paper describes the research and development of MSCs isolation from various sources. This review is a literature review through a literature search that outlines various studies and development of MSCs isolation and culture, MSCs cryopreservation, MSCs differentiation ability, MSCs immunotolerant, application of MSCs to degenerative diseases, MSCs homing, and update: MSCs name controversy. The material used as study material in the literature published in the period 2009-2019. Mesenchymal stem cells (MSC) can differentiate into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, hepatic cells, neurons, and others. MSC can be isolated from various sources such as bone marrow, adipose tissue, extra-fetal tissue (Wharton jelly and umbilical cord blood), teeth, and skin. MSC has great potential for the treatment of degenerative diseases and brings a major breakthrough in the field of modern medicine. Stem cell research continues to develop, but on the other hand, it remains controversial because it is considered to be less ethical, especially those originating from embryonic stem cells.

Keywords: Development, isolation, mesenchymal stem cells, research, therapy

PENDAHULUAN

Saat ini, terdapat pergeseran pola penyakit yaitu meningkatnya penyakit tidak menular atau penyakit degeneratif, misalnya penyakit jantung, hipertensi, stroke,

diabetes, penyakit yang berhubungan dengan sistem saraf (misalnya Parkinson, Alzheimer, dan Huntington), penyakit-penyakit autoimun dan sebagainya. Penyakit ini ditandai dengan memburuknya suatu jaringan atau organ tertentu sehingga kondisi kesehatan pasien juga makin tidak membaik. Beberapa penyakit tidak menular atau penyakit

degeneratif ada yang tidak dapat disembuhkan walaupun sudah diobati dengan berbagai cara. Oleh sebab itu, perkembangan teknologi dalam dunia kedokteran modern telah mengarah pada pendekatan regeneratif untuk mengatasi penyakit degeneratif tersebut (Handajani et al. 2010; Singh 2016).

Pengobatan regeneratif merupakan salah satu cabang dari ilmu kedokteran yang berkaitan dengan pemulihan fungsi dari jaringan atau organ pasien dengan penyakit kronis. Upaya transplantasi jaringan atau organ belum dapat diandalkan. Oleh sebab itu, salah satu pengobatan regeneratif yang dapat menumbuhkan harapan kesembuhan mulai dikembangkan saat ini yaitu dengan memanfaatkan potensi besar yang dimiliki sel punca untuk memperbaiki jaringan atau organ tubuh yang terkena penyakit (Labusca et al. 2018).

Sel punca adalah sel yang mampu memperbaiki dirinya sendiri (*self renewal*), belum memiliki bentuk dan fungsi yang spesifik (*undifferentiated*) tetapi dapat berdiferensiasi menjadi sel lainnya (Halim 2010). Berdasarkan sumbernya, sel punca dapat dibagi menjadi beberapa jenis yaitu sel punca embrionik, sel punca dewasa, dan sel punca yang diinduksi menjadi *pluripotent (induced pluripotent stem cells - iPSCs)* (Sun et al. 2014).

Salah satu jenis sel punca adalah sel punca mesenkim (SPM). SPM bersifat multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel tetapi terbatas hanya satu golongan sel saja dan dapat mengekspresikan beberapa penanda spesifik. SPM dapat diisolasi dari berbagai sumber, yaitu dari sumsum tulang, jaringan lemak, pulpa gigi, *Wharton jelly*, darah tali pusat dan lain-lain. Saat ini, banyak metode dalam isolasi dan sel punca mesenkim. (Laverdet et al. 2014). Oleh sebab itu, tulisan ini akan menguraikan tentang penelitian dan perkembangan isolasi dan kultur SPM dari berbagai sumber, karakteristik dan kemampuan SPM termasuk sifat imunotoleran serta *homing* SPM.

BAHAN DAN METODE

Tulisan ini merupakan assessment laporan atau artikel penelitian mengenai penelitian dan perkembangan isolasi SPM dari berbagai sumber yang telah dipublikasikan di berbagai jurnal ilmiah. Tulisan ini diawali dengan mengumpulkan referensi berupa literatur yang dipublikasi (jurnal, buku dan laporan penelitian dari dalam dan luar negeri) melalui internet. Kemudian dilakukan kajian literatur yang berkaitan dengan berbagai penelitian dan pengembangan isolasi dan kultur SPM, kemampuan diferensiasi SPM, kriopreservasi atau simpan beku SPM, sifat imunotoleran SPM, aplikasi SPM terhadap penyakit degeneratif, *homing* SPM, dan perkembangan terkini: kontroversi istilah SPM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sel punca

Sel punca atau *stem cell* didefinisikan sebagai suatu sel yang memiliki sifat unik yaitu mampu memperbaiki diri (*self renewal*) dan mampu berdiferensiasi menjadi sel lain. Sel punca memiliki jenis-jenis sel yang beragam berdasarkan sumber dan kemampuan diferensiasinya. Walaupun sel punca merupakan sel yang belum terdiferensiasi (*undifferentiated*), tetapi sel punca dapat menghasilkan sel yang terspesialisasi, seperti sel otot, sel otot jantung, sel lemak, sel darah atau sel saraf (*neuron*). Karakteristik sel punca tersebut berpotensi untuk digunakan sebagai sumber transplantasi pada terapi berbasis sel untuk pengobatan penyakit-penyakit degeneratif contohnya pada penyakit jantung, diabetes melitus, dan penyakit lainnya (Halim 2010).

Berdasarkan sumbernya, ada dua macam sel punca (Balogh and Engelmann 2011) yaitu :

Sel punca embrionik

Sel punca embrionik adalah sel punca yang berasal dari embrio pada tahap perkembangan sebelum terjadinya implantasi di uterus. Embrio yang digunakan biasanya berumur 4-5 hari setelah fertilisasi pada fase blastosit. Sel punca ini memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi semua jenis sel pada tubuh dan memiliki dua karakteristik penting yaitu kemampuan memperbaiki dirinya sendiri dan bersifat *pluripoten*.

Sel punca dewasa

Sel punca dewasa adalah sel punca yang belum berdiferensiasi yang dapat ditemukan di seluruh tubuh. Sel punca dewasa yang pertama kali ditemukan adalah di sumsum tulang, yaitu sel punca hematopoietik yang dapat menghasilkan seluruh sel darah merah, sel darah putih dan keping darah. Sel punca dewasa ini telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber jaringan seperti sumsum tulang, jaringan lemak, *Wharton jelly*, pulpa gigi dan lain-lain. Sebagian besar sel punca dewasa bersifat multipoten dan diberi nama berdasarkan asal jaringannya, misalnya adalah sel punca mesenkim, sel punca jaringan lemak dan sel punca hematopoietik, dan sel punca endotelial.

Sedangkan berdasarkan kemampuan berdiferensiasinya, sel punca dapat dibagi menjadi (Zakrzewski et al. 2019):

Sel punca totipoten

Sel punca totipoten adalah sel punca dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel, baik menjadi sel embrionik ataupun sel ekstra embrionik. Sel ini diproduksi dari gabungan sel telur dan sel sperma. Contohnya adalah telur yang telah terfertilisasi menjadi zigot.

Sel punca pluripoten

Sel punca pluripoten adalah sel punca yang merupakan turunan dari sel punca totipoten. Sel punca ini dapat berdiferensiasi menjadi hampir seluruh jenis sel, yaitu menjadi 3 lapisan germinal yaitu ektoderm, mesoderm, dan endoderm, tapi tidak dapat menjadi jaringan ekstra

embrionik seperti plasenta dan tali pusat. Contohnya adalah sel punca embrionik.

Sel punca multipoten

Sel punca multipoten adalah sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel yang terbatas dalam satu golongan sel saja. Contoh sel punca ini adalah sel punca mesenkim (SPM) dan sel punca hematopoietik.

Sel punca unipoten

Sel punca unipoten adalah sel punca yang hanya dapat berdiferensiasi menjadi 1 jenis sel saja tetapi masih memiliki sifat dapat memperbarui diri atau meregenerasi dirinya sendiri. Contohnya adalah sel punca otot (Rantam 2009).

Sel punca mesenkim (SPM)

Sel punca mesenkim (SPM) atau yang juga dikenal sebagai *mesenchymal stem cells* (MSCs) adalah suatu jenis sel punca yang awalnya berasal dari sumsum tulang selain sel punca hematopoietik. Friedenstein et al. (1974) telah berhasil mengisolasi dan menggambarkan SPM dari sumsum tulang tikus yang mirip fibroblas dan dapat melekat di dasar cawan kultur. SPM kemudian berkembang dan berhasil diisolasi dari berbagai sumber, yaitu dari jaringan lemak, pulpa gigi, *Wharton jelly*, darah perifer, darah tali pusat dan lain-lain (Laverdet et al. 2014). Jika dikultur, SPM akan menghasilkan *cell line* yang bentuknya mirip seperti fibroblast (*fibroblast like cell*). Dalam riset sel punca, SPM dapat berperan sebagai alat diagnostik dimana SPM dapat diaplikasikan untuk uji kerusakan sel akibat infeksi dari virus dan uji obat baru (Rantam 2009).

SPM adalah sel punca dewasa yang harus memiliki minimal 3 kriteria menurut *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Tabel 1). Kriteria yang pertama adalah sel dapat melekat pada dasar petridish plastik (*plastic-adherent*) dengan medium kultur standar. Kriteria yang kedua adalah sel dapat mengekspresikan penanda *cluster of differentiation* (CD)105, CD73, CD90 dan tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79alpha atau CD19 dan *human leukocyte antigen DR* (HLA-DR) pada permukaan sel. Kriteria yang ketiga adalah sel punca mesenkim dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit dan kondroblas secara *in vitro* (Dominici et al. 2006).

Tabel 1. Kriteria sel punca mesenkim berdasarkan *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Dominici et al. 2006)

| | | |
|----|---|-------------------------|
| 1. | Dapat melekat pada wadah kultur. | |
| 2. | Fenotip | Positif (> 95% +) |
| | | Negatif (< 2% +) |
| | | CD45 |
| | | CD73 |
| | | CD34 |
| | | CD90 |
| | | CD14 atau CD11b |
| | | CD79 α atau CD19 |
| | | HLA-DR |
| 3. | Dapat berdiferensiasi menjadi osteoblast, adiposit, dan kondroblast secara kultur <i>in vitro</i> . | |

Isolasi dan kultur SPM

Isolasi SPM dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis sumber seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, jaringan ekstra-fetus (*Wharton jelly* dan darah tali pusat), gigi dan kulit (Laverdet et al. 2014). Proses isolasi dan karakterisasi SPM telah berhasil dilakukan pada beberapa spesies, meliputi mencit, tikus, anjing, kelinci domba, ayam, babi dan manusia (Soleimani and Nadri 2009; Azandeh et al. 2012; Lyahyai et al. 2012; Huang et al. 2015; Feyen et al. 2016; Groza et al. 2016; Liu et al. 2018; Adhikari et al. 2019).

SPM dari sumsum tulang

Isolasi SPM dari sumsum tulang dapat dilakukan dengan dua cara yaitu:

Metode flushing

Metode *flushing* adalah suatu metode isolasi SPM dengan menggunakan *syringe* yang berisi medium kultur untuk mengambil sumsum tulang kemudian suspensi dimasukkan ke dalam wadah kultur (*petridish* atau *flask*) (Abdullah et al. 2018).

Huang et al. (2015) berhasil melakukan isolasi SPM dari sumsum tulang mencit dengan metode flushing tanpa melakukan filtrasi dan pencucian sel. Medium yang digunakan adalah α -Minimal Essential Medium (α -MEM) yang disuplementasi dengan 15% *foetal bovine serum* (FBS) dan 1% *penicillin streptomycine neomycin* (PSN) tanpa diberikan penambahan faktor pertumbuhan. Hasil isolasi menunjukkan bahwa sel positif terhadap penanda SPM yaitu CD44 dan CD90, serta *negative* terhadap CD31 dan CD45 (Huang et al. 2015).

Isolasi SPM dari sumsum tulang juga berhasil dilakukan oleh (Rinendyaputri and Noviantari 2015) dengan membandingkan medium kultur *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) dan *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM) untuk produksi SPM yang diisolasi dari sumsum tulang tibia dan femur mencit dengan metode *flushing*. Pada penelitian ini, tulang tibia dan femur mencit dibersihkan dari lemak dan didekontaminasi menggunakan alkohol 70% selama 2 menit. Setelah bersih kedua ujung tulang dipotong dan di *flushing* menggunakan *syringe* 1 mL dengan medium kultur DMEM dan MEM. Penggantian medium dilakukan setelah 48 jam kultur. Hasil menunjukkan bahwa jumlah SPM yang diperoleh dari sumsum tulang tibia dan femur mencit lebih banyak dengan MEM sebagai medium kultur dibandingkan dengan DMEM.

Metode gradien densitas sel

Selain dengan metode *flushing*, isolasi SPM dapat dilakukan dengan metode gradien densitas sel yaitu suatu metode isolasi SPM menggunakan alat sentrifugasi sehingga sel akan terpisah berdasarkan gradien densitas selnya. Bahan yang dapat digunakan dalam metode ini adalah larutan Ficoll atau Percoll (Pösel et al. 2012). Sangeetha et. al (2017) melaporkan bahwa setelah dilakukan *flushing*, isolasi SPM dilanjutkan dengan mensentrifugasi suspensi sel kemudian akan terbentuk lapisan-lapisan, dan SPM dapat diisolasi dari lapisan *buffy*

coat yang berisi sel mononuklear (*peripheral blood mononuclear cells*-PBMC). Setelah diisolasi, SPM menunjukkan morfologi sel yang bentuknya seperti sel fibroblast dan dapat berdiferensiasi menjadi sel adiposit, osteoblas dan sel kondrosit yang dikonfirmasi dengan pewarnaan menggunakan *oil red O*, *alizarin red* and *Alcian blue* (Sangeetha et al. 2017).

SPM dari jaringan lemak

Isolasi SPM dari jaringan lemak (lipoaspirat) dapat dilakukan dengan metode enzimatis menggunakan enzim kolagenase. Pawitan et al. (2013) berhasil melakukan modifikasi pada isolasi SPM dengan jaringan lemak menggunakan saringan kopi/teh yang dapat mengefektifkan waktu dan dapat menghasilkan sel yang tumbuh lebih baik dalam medium komplit komersial *MesenCult (Stemcell Technologies)* (Pawitan et al. 2013). Lipoaspirat didiamkan kemudian dilakukan beberapa kali penyaringan dan sentrifugasi sehingga didapatkan *pellet* sel yang kemudian ditanam dalam wadah kultur dan diinkubasi (Cheng et al. 2011).

SPM dari pulpa gigi

Isolasi SPM dari pulpa gigi (*stem cells from human exfoliated deciduous*-SHED) telah dilakukan oleh Zainuri et al. (2018). Gigi direndam dalam 1% *povidone-iodine* lalu dicuci PBS yang ditambah dengan 1% *antibiotic-antimycotic* kemudian dikultur dalam medium kultur yaitu α -*modified eagle medium* (α -MEM) yang disuplementasi dengan NaHCO_3 , 10% *fetal bovine serum* (FBS), 1% *antibiotic-antimycotic*, dan 1% *non-essential amino acid* (NEAA). SPM dari pulpa gigi kemudian dikarakterisasi dengan *flowcytometry* menggunakan *human MSC analysis kit* yang positif dengan penanda CD90, CD73, and CD105, tetapi negatif terhadap penanda CD45, CD34, CD11b, CD19, dan HLA-DR. SPM dari pulpa gigi (SHED) dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit dan adiposit yang dikonfirmasi menggunakan pewarnaan *alizarin red*, *alcian blue*, dan *oil red o* (Zainuri et al. 2018).

SPM dari Wharton Jelly

Isolasi SPM dari *Wharton jelly* tali pusat (Azandeh et al. 2012) dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu:

Metode eksplan

Pada metode eksplan, tali pusat dipotong menjadi beberapa potongan dengan ukuran sekitar 1 cm x 1 cm kemudian diletakkan dalam cawan petri berisi larutan desinfektan *povidone iodine* 10% dan alkohol 70% masing-masing sekitar 3-5 menit. Bilas potongan tali pusat (eksplan) tersebut dalam larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dan antibiotik-antimikotik 1% dan letakkan potongan eksplan pada wadah kultur (*well* atau cawan petri steril) lain sehingga permukaan dalam tali pusat (*Wharton Jelly*) menghadap/menempel pada permukaan wadah. Tambahkan medium kultur secukupnya dan ganti medium kultur setiap 2-3 hari sekali.

Metode enzimatis

Pada metode enzimatis, potongan *Wharton jelly* (WJ) tali pusat dicacah dengan ukuran 1 cm x 1 cm kemudian dicuci dengan PBS. Kemudian potongan WJ dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 mL berisi medium *low glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium* (LG-DMEM) yang ditambah 4 mg/mL *Collagenase Type I* dan 1 mg/mL *Hyaluronidase* kemudian diinkubasi selama 1 jam. Setelah itu, tambahkan 0.1% *trypsin ethylene diamine tetraacetic acid* (*trypsin-EDTA*) selama 30 menit dalam inkubator 37°C dan 5% CO_2 . Kemudian potongan WJ dicuci dengan PBS dan dipindahkan ke dalam *conical tube* 50 mL yang baru. Suspensi dilarutkan dalam PBS dengan perbandingan 1:2 kemudian saring suspensi eksplan kecil WJ dengan nylon filter ukuran 70 μm dan tampung hasil saringan di cawan petri kecil steril terpisah. Observasi suspensi tersebut dengan mikroskop *inverted* apakah sudah teramat sel. Tambahkan medium kultur yaitu LG-DMEM yang disuplementasi dengan 2 mM *L-glutamine*, 20% *fetal bovine serum*, dan 100 U *penicillin/streptomycin*. kemudian diinkubasi pada 37°C dan 5% CO_2 .

Kriopreservasi

Kriopreservasi atau simpan beku merupakan suatu metode penyimpanan sel dalam keadaan inaktif yaitu dengan pendinginan mencapai suhu di bawah 0°C (*subzero*) sehingga dapat digunakan kembali dengan cara melakukan pencairan sel (*thawing*). Dalam penyimpanan sel dalam waktu yang cukup lama, suhu ideal yang dibutuhkan adalah -196°C di mana sel disimpan dalam nitrogen cair. Sebelum sel dimasukkan dalam nitrogen cair, sel dibekukan secara lambat dengan laju penurunan suhu 1°C/menit hingga suhu -80°C selama *overnight*. Masalah utama pada metode simpan beku atau kriopreservasi adalah terbentuknya kristal es dan *osmotic shock* yang menyebabkan kerusakan dan kematian sel (Djuwantono et al. 2011).

Terdapat 2 metode kriopreservasi atau simpan beku yaitu:

Kriopreservasi konvensional

Kriopreservasi konvensional merupakan metode simpan beku dengan kecepatan pembekuan sel diatur menggunakan alat pembekuan terprogram (*programmable freezing machine*) dengan metode *temperature-controlled slow-freezing*. Kekurangan metode ini adalah adanya kemungkinan terbentuknya kristal es yang dapat mengakibatkan kerusakan dan kematian sel akibat pembekuan sel yang lambat. Selain itu, harga alatnya cukup mahal dan tidak praktis untuk aplikasi (Rinendyaputri et al. 2017).

Vitrifikasi

Vitrifikasi merupakan metode simpan beku dengan proses pembekuan dilakukan sangat cepat dengan menggunakan krioprotektan yang berkonsentrasi tinggi yang menyebabkan cairan di dalam dan luar sel menjadi *glassy (glasslike/vitreous)* sehingga kristal es tidak terbentuk. Metode vitrifikasi ini memiliki kelebihan dalam simpan beku sel karena tekniknya lebih mudah, murah, efisien, cepat dan sederhana. Adanya proses pembekuan sel

yang cepat juga dapat mengurangi toksisitas krioprotektan yang digunakan karena tidak terpapar lama pada sel yang akan disimpan beku. Vitrifikasi merupakan metode kriopreservasi yang telah digunakan untuk penyimpanan beku pada *embryonic stem cells* (ESCs), *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) dan sel punca dewasa (*adult stem cells*) seperti SPM. Simpan beku (kriopreservasi) dilakukan untuk menjaga ketersediaan sel punca (*stem cell*) baik untuk penelitian maupun untuk terapi (Rinendyaputri et al. 2018).

Kemampuan diferensiasi SPM

SPM memiliki sifat multipoten, yang artinya SPM tersebut dapat berdiferensiasi menjadi sel lain. Beberapa penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa SPM dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, adiposit, sel hepatik, *neuron* dan lain-lain. Teknik dalam mendiferensiasikan SPM menjadi beberapa sel tersebut telah banyak dilakukan, yaitu dengan menambahkan faktor penginduksi dan faktor pertumbuhan ke dalam medium kultur secara *in vitro* (Tabel 2) (Taran et al. 2014). Untuk mengetahui potensi diferensiasi SPM dilakukan kultur SPM dalam medium induksi diferensiasi yaitu medium induksi kondrosit, osteoblas dan adiposit. Kemudian hasil dikonfirmasi dengan pewarnaan spesifik untuk setiap jenis sel yaitu *alcian blue* untuk kondrosit, *alizarin red* untuk osteoblas dan *oil red o* untuk adiposit. Sedangkan kemampuan diferensiasi SPM menjadi *neuron* dilaporkan oleh Guan et al. (2014). SPM dari sumsum tulang tikus dapat berdiferensiasi menjadi *neuron* dalam medium induksi yang ditambahkan beberapa faktor pertumbuhan. Perkembangan *neuron* terjadi secara perlahan dengan sel yang berhubungan satu dengan yang lain membentuk cincin atau struktur seperti jaring. Konfirmasi dengan uji imunositokimia menunjukkan ekspresi penanda *neuron* yaitu Nestin dan *microtubule associated protein-2* (MAP-2) (Guan et al. 2014).

Sifat imunotoleran SPM

SPM memiliki kemampuan sekresi faktor-faktor trofik, kemampuan memperbarui diri yang tinggi secara *in vitro*, dan sebagai imunomodulator. SPM dapat diaplikasikan sebagai terapi penyakit alternatif yang berhubungan dengan sistem imun (Faiella and Atoui 2016). SPM mempunyai efek imunomodulasi yang mempengaruhi kerja sel limfosit T dan B, sel *natural killer* (NK) dan sel *antigen presenting cells* (APC). Tetapi SPM bersifat hipoinmunogenik karena sedikit mengekspresikan *Major Histocompatibility* (MHC) kelas I dan tidak mengekspresikan MHC kelas II atau molekul kostimulasi (CD40, CD40L, CD80 atau CD86), sehingga penggunaan SPM secara alogenik tidak memerlukan pencocokan terhadap HLA (Carrion and Figueroa 2011).

Mekanisme imunomodulasi SPM adalah sebagai berikut: SPM dan ekstraseluler vesikel (EV) dapat memberi efek pada sistem imun bawaan (sel NK, neutrofil, monosit, dan makrofag), sistem imun adaptif (sel B dan sel T), serta sel dendritik (DC) melalui interaksi sel ke sel dan beberapa faktor imunomodulator. Sel T yang teraktivasi akan mengaktifkan SPM yang istirahat, kemudian memfasilitasi

perekrutan sel T efektor dan penolong melalui CXCL9 dan CXCL10. Beberapa faktor imunomodulator (*transforming growth factor* β -TGF- β , *prostaglandin* E2-PGE2, dan HLA-G5) dan molekul yang terikat membran (PD-L1) menekan proliferasi sel T CD4+ dan CD8+ dan menginduksi polarisasi sel T CD4+ terhadap sel Th17. *Nitric oxide* (NO) dan enzim *indoleamine-2,3-dioxygenase* (IDO) yang dilepas SPM akan menekan proliferasi sel T CD8+, produksi sitokin, dan sitotoksitas. SPM akan mendukung perkembangan populasi sel Treg melalui *interleukin* (IL)-10, TGF- β , dan HLA-G5. Dalam konteks sel B, SPM menghambat aktivasi, proliferasi, ekspresi reseptor kemokin, dan diferensiasi pada sel plasma yang mensekresi antibodi. SPM akan menekan polarisasi makrofag naif untuk makrofag M1 proinflamasi, kemudian mendukung polarisasi M2 anti-inflamasi. IL-6 yang dikeluarkan oleh SPM akan menekan apoptosis netrofil (Guerrouahen et al. 2019).

Aplikasi SPM terhadap penyakit degeneratif

SPM dapat diisolasi dari berbagai sumber, dapat mengekspresikan beberapa penanda spesifik dan mampu berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, adiposit, serta *neuron*. Oleh sebab itu, SPM berpotensi besar dalam terapi penyakit degeneratif. SPM membawa sebuah terobosan besar pada bidang kedokteran modern sebagai hasil penelitian dan pengembangan tingkat dasar dalam bidang biologi.

Tabel 2. Faktor penginduksi dan faktor pertumbuhan untuk induksi diferensiasi SPM menjadi adiposit, kondrosit, osteosit, sel jantung, sel hepatik, neuron, dan sel pankreas (Cheng et al. 2011)

| Typo Diferensiasi | Faktor-Faktor Penginduksi Diferensiasi |
|---------------------|--|
| Adipogenik | Insulin, IBMX, <i>dexamethasone</i> , <i>rosiglitazone</i> , <i>indomethacin</i> . |
| Kondrogenik | 5-Aza BMP-6, 5-Aza BMP-7, GFG-2, TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, <i>dexamethasone</i> , IGF-1. |
| Osteogenik | 1,25(OH) ₂ D ₃ , β - <i>glycerophosphate</i> , <i>ascorbic acid</i> , BMP-2, <i>dexamethasone</i> , <i>valproic acid</i> . |
| Kardiomiogenik | TSA, 5-Aza |
| Hepatik | HGF, OSM, DMSO |
| Neurogenik | EGF, FGF, 25uM <i>fluvastatin</i> , B27/Neurobasal medium (B27/N medium), 5- <i>azacytidine</i> |
| Pankreatik/Endokrin | <i>Activin-A</i> <i>exendin-4</i> , pentagastrin, HGF, <i>nicotinamide</i> , <i>high glucose concentration</i> |

Keterangan: 1,25(OH)₂D₃: 1,25-*dihydroxy-cholecalciferol*; BMP: *bone morphogenetic*; DMSO: *dimethyl sulfoxide*; EGF: *epidermal growth factor*; FGF: *fibroblast growth factor*; HGF: *hepatocyte growth factor*; IBMX: 3-*isobutyl-1-methylxanthine*; IGF: *insulin-like growth factor*; IL: *interleukin*; OSM: *oncostain M*; TGF: *transforming growth factor*; TSA: *trichostatin A*; 5 Aza: 5-*azacytidine*.

Berikut berupa aplikasi SPM dalam terapi penyakit degeneratif yaitu:

Aplikasi SPM pada penyakit jantung

Penelitian yang dilakukan Santoso et al. (2011) menyebutkan bahwa pasien infark miokard dapat diterapi dengan injeksi intrakoroner dari sel punca dari darah perifer (*peripheral blood stem cells*-PBSC) yang dikombinasi dengan *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) dan *erythropoietin* (EPO). Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama dan setelah pemberian PBSC tidak dijumpai komplikasi pada pasien selama pemantauan dalam waktu 12-30 bulan (Santoso et al. 2011).

Aplikasi SPM pada penyakit stroke

Stroke menyebabkan kematian sel-sel *neuron* di otak, yang dapat menimbulkan kecacatan karena *neuron* tidak dapat melakukan regenerasi. Aplikasi SPM pada penyakit *stroke* dilakukan untuk meregenerasikan *neuron* yang telah mengalami kerusakan setelah terjadi *stroke* pada pasien. Penelitian yang dilakukan oleh Lee et al. (2010) melaporkan bahwa transplantasi SPM dari sumsum tulang secara intravena pada pasien *stroke* dapat memulihkan kondisi pasien setelah *stroke*. Terapi sel punca dapat menggantikan sel punca *neuron* di otak, selain itu SPM dapat mensekresikan sitokin, faktor pertumbuhan dan faktor neurotrofik yang meningkatkan fungsi saraf dalam neurogenesis, angiogenesis dan sinaptogenesis (Lee et al. 2010).

Aplikasi SPM pada penyakit diabetes

Penyakit diabetes adalah penyakit yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah karena resistensi insulin dan adanya kerusakan sel β -*pancreas*. Zakariya et al. (2018) melaporkan bahwa SPM dari tali pusat tikus dapat ditransplantasikan ke mencit yang sudah diinduksi *streptozotocin* sebagai hewan model diabetes. Hasil penelitian menunjukkan bahwa SPM dapat meregenerasi kerusakan jaringan pankreas yaitu meningkatkan jumlah sel islet pankreas dan meningkatkan kadar faktor pertumbuhan *platelet-derived growth factor* (PDGF) sebagai indikator pertumbuhan sel islet pada pankreas (Zakariya and Agung 2018).

Aplikasi SPM pada penyakit yang berhubungan dengan system saraf (Parkinson)

Penyakit parkinson adalah penyakit neurodegeneratif yang bersifat progresif dan berhubungan dengan gerakan. Penyakit ini sering dijumpai pada individu yang berusia lebih dari 60 tahun. Terapi penyakit Parkinson mulai dilakukan dengan transplantasi sel punca yang bertujuan untuk mengganti sel dopaminergik yang rusak. Mekanisme sel punca dalam terapi pada penyakit Parkinson adalah dengan sel mensekresikan sejumlah sitokin atau faktor pertumbuhan yang dapat meningkatkan perbaikan sel saraf dan sel punca dapat berdiferensiasi dan menggantikan sel saraf yang mengalami kematian (Gunawan et al. 2017). Penelitian lain melaporkan bahwa transplantasi sel punca mesenkim yang berasal dari sumsum tulang belakang melalui intra nasal dapat diaplikasikan pada hewan model

Parkinson yang dapat menurunkan konsentrasi sitokin inflamasi (Danielyan et al. 2011).

Homing sel punca

Secara alami, sel punca dapat memperbaiki kerusakan jaringan baik sel punca yang berasal dari sekitar jaringan yang rusak ataupun yang berasal dari sumber sel punca yang letaknya cukup jauh dari jaringan yang rusak. Agar sel punca dapat bekerja, diperlukan proses *homing* dari tempat asalnya, yang apabila letak sel punca jauh dari jaringan yang mengalami kerusakan, maka sel punca harus melalui pembuluh darah untuk menuju ke jaringan yang mengalami kerusakan. Proses *homing* ini melibatkan berbagai mekanisme seluler dan molekuler untuk membentuk neovaskularisasi pada daerah infark di jaringan yang rusak dengan melibatkan berbagai macam sitokin, faktor pertumbuhan, dan hormon yang berasal dari jaringan target. Sel punca dapat *homing* ke tempat neovaskularisasi dan berperan pada regenerasi vaskular karena dapat berdiferensiasi menjadi endotel, kardiomyosit, dan sel otot polos, mensekresi faktor angiogenik dan membentuk kapiler baru (Jujo et al. 2009). Selain itu, faktor-faktor yang mempengaruhi punca yang ditransplantasi dapat mengalami *homing* ke jaringan target adalah faktor lingkungan mikro (*micro-environment*) untuk pertumbuhan dan berfungsinya sel-sel tersebut serta integrin dan molekul adhesi, reseptor *homing*, keadaan iskemia, dan peningkatan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Lee and Makkar 2004).

Penelitian tentang terapi SPM untuk berbagai aplikasi klinis telah banyak dilakukan. Untuk aplikasi SPM secara klinis dilakukan secara sistemik yang membutuhkan *homing* dan migrasi SPM ke jaringan target. Tetapi jumlah SPM yang bermigrasi dan *homing* ke jaringan target hanya sedikit, SPM tidak mengekspresikan banyak reseptor untuk *homing*. Mekanisme *homing* SPM diasumsikan mirip dengan *homing* leukosit yaitu: Pertama, sel kontak dengan endotelium melalui *tethering* dan *rolling*, sehingga menyebabkan perlambatan sel-sel dalam aliran darah. Kedua, sel diaktivasi oleh reseptor *G-protein-coupled*, yang diikuti dengan *integrin-mediated*. Ketiga, terjadi proses penangkapan (*arrest*) oleh endotelium kemudian sel-sel berpindah melalui endotelium menuju membran basal (Becker and Riet 2016).

Pada aplikasi klinis sel punca, misalnya pada terapi infark miokard diperlukan cara pemberian sel punca yang aman sehingga dapat dipastikan bahwa sel punca yang diberikan menuju ke jaringan target (*homing*). Sel punca yang ditransplantasi harus memenuhi tiga mekanisme (Wang and Sjoquist 2006) sebagai berikut yaitu:

Trafficking sel punca

Terjadinya iskemia pada jaringan target dapat menginduksi pembentukan sitokin, reseptor yang larut dan molekul adhesi sehingga mengakibatkan mobilisasi berbagai sel punca ke tempat cedera melalui proses *homing*. Pada infark miokard akut, sitokin yang diproduksi adalah *stromal derived factor-1 α* (SDF-1 α), *tenascin C*, *fibronectin*, *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1), *laminin* dan VEGF. Beberapa sitokin ini melepas protease

yang dapat memecah molekul adhesi sehingga membantu sel-sel punca terlepas dari matriks sumsum tulang. Selain itu, *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) dapat diberikan untuk meningkatkan pelepasan matriks *metalloproteinase-9*, *neutrophil elastase*, dan *cathepsin G* yang dapat memecah molekul adhesi dalam stroma sumsum tulang dan memfasilitasi mobilisasi *hematopoietic stem cells* (HSCs).

Diferensiasi sel punca menjadi kardiomyosit.

Diferensiasi sel punca menjadi kardiomyosit sangat penting untuk regenerasi setelah terjadi infark pada jaringan target yang diaktivasi oleh G-CSF dan *jagged-1 protein*.

Efek parakrin

Efek parakrin bertujuan untuk mengaktivasi sel punca jantung residen dan menyelamatkan kardiomyosit yang malfungsi di daerah infark. Sitokin-sitokin yang dihasilkan sel punca karena efek parakrin tersebut adalah *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) yang melindungi kardiomyosit terhadap cedera hipoksia, VEGF meningkatkan angiogenesis pada daerah perbatasan iskemia, *cardiotrophin-1* bersifat proteksi terhadap kematian sel non-iskemik, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *oncostatin*, *tumor necrosis factor- β* (TNF- β), IL-1 α , dan IL-6 dapat memperpanjang hidup miosit serta sel punca transplan dapat mengubah matriks ekstrasel dan mendukung terjadinya remodeling dengan cara menurunkan produksi kolagen tipe I, III, *tissue inhibitor* dari *metalloproteinase 1* (Novotny et al. 2008).

Perkembangan terkini: Kontroversi istilah sel punca mesenkim

Sel punca mesenkim secara resmi dinamai lebih dari 25 tahun yang lalu untuk mewakili sel yang diisolasi dari sumsum tulang manusia dan mamalia serta dapat diperbanyak secara kultur *in vitro* dan dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel lainnya. Dari tahun 1990, banyak penelitian mengenai kemampuan regeneratif dari SPM.

Saat ini, ratusan uji klinik dilakukan untuk menguji kemampuan SPM dalam mengobati suatu penyakit yang berfokus pada kemampuan diferensiasi SPM yang bersifat multipoten. Hal yang disayangkan adalah fakta bahwa SPM disebut "sel punca" digunakan untuk menyimpulkan bahwa pasien akan menerima manfaat medis langsung, karena mereka menganggap bahwa sel-sel ini akan berdiferensiasi menjadi sel-sel penghasil jaringan yang melakukan regenerasi, misalnya pada penyakit osteoarthritis dan penyakit neurologi seperti demensia. Oleh sebab itu, terdapat usulan bahwa sel punca mesenkim tidak tepat untuk nama dari sel ini, sebaiknya diganti menjadi *Medicinal Signaling Cells* yang menunjukkan bahwa sel ini berada di tempat cedera atau penyakit dan dapat mengeluarkan faktor-faktor tertentu yang bersifat imunomodulator dan trofik (bersifat regeneratif) sebagai terapi suatu penyakit. Dimana sel punca yang dimiliki pasien dapat membentuk jaringan baru yang distimulasi dari faktor-faktor bioaktif yang disekresikan oleh SPM yang ditransplantasikan secara eksogen (Caplan 2017).

Meskipun berpotensi untuk terapi, status penggunaan sel punca di Indonesia, masih menimbulkan kontroversi karena belum adanya regulasi yang jelas. Selain itu, sel punca juga masih mengundang kontroversi terutama pada penggunaan sel punca embrionik yang diperoleh dari embrio manusia karena dianggap kurang etis sehingga dianggap menggagalkan kehidupan manusia. Untuk menghindari kontroversi tersebut, digunakan alternatif lain dalam penggunaan sel punca embrionik dengan memanfaatkan sel punca dewasa dan sel punca ekstraembrional (Tursina 2019; Hartono 2016).

Sel punca mempunyai kemampuan untuk memperbarui diri (*self renewal*) dan berdiferensiasi menjadi sel lain. Sel punca mesenkim (SPM) dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, adiposit, sel hepatik, *neuron*, dan lain-lain. SPM berpotensi besar untuk pengobatan penyakit degeneratif dan menjadi terobosan besar pada bidang kedokteran modern. SPM dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti sumsum tulang, jaringan lemak, jaringan ekstra-fetus (*Wharton jelly* dan darah tali pusat), gigi dan kulit. SPM memiliki efek imunomodulasi sehingga dapat mempengaruhi kerja sel limfosit T dan B, sel *natural killer* (NK) dan sel *antigen presenting cells* (APC) namun bersifat hipoinmunogenik. Proses *homing* dari tempat asalnya dan melibatkan berbagai mekanisme seluler dan molekuler diperlukan agar sel punca dapat bekerja. Apabila letak sel punca jauh dari jaringan yang mengalami kerusakan, maka sel punca harus melalui pembuluh darah untuk menuju ke jaringan yang mengalami kerusakan. Meskipun berpotensi untuk terapi, namun sel punca masih mengundang kontroversi dalam penggunaan sel punca embrionik karena diperoleh dari embrio manusia sehingga dianggap menggagalkan kehidupan manusia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan dan Kepala Badan Litbangkes yang telah memberikan suasana kondusif dalam penelitian dan pengembangan sel punca serta ucapan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung dalam penulisan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah RH, Yosef YN, Saleh SM, Mohamed MH, Majeed ASA. 2018. Direct and simple method for mesenchymal stem cells isolation, culturing and detection. *Int J Stem Cell Res Ther* 5 (2): 1-5.
- Adhikari R, Chen C, Waters E, West FD, Kim WK. 2019. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from broiler chicken compact bones. *Front Physiol*. DOI: 10.3389/fphys.2018.01892.
- Azandeh S, Orazizadeh M, Hashemitabar M, Khodadadi A, Shayesteh AA, Nejad DB, Gharravi AM, Allahbakhshi E. 2012. Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. *J Biomed Sci Eng* 5: 580-586.
- Balogh P, Engelmann P. 2011. Transdifferentiation and regenerative medicine. http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A-Transzdifferentiacio_en_book/ch01s06.html.
- Becker AD, Riet IV. 2016. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?. *World J Stem Cells* 8 (3): 73-87.

- Caplan AI. 2017. Mesenchymal stem cells: Time to change the name!. *Stem Cells Transl Med* 6 (6): 1445-1451.
- Carrion FA, Figueroa FE. 2011. Mesenchymal stem cells for the treatment of systemic lupus erythematosus: Is the cure for connective tissue diseases within connective tissue?. *Stem Cell Res Ther* 2 (23): 1-8.
- Cheng K, Kuo T, Kuo K, Hsiao C. 2011. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Med Biomarkers Heal Sci* 3 (2): 53-62.
- Danielyan L, Schäfer R, Ameln-Mayerhofer AV, Bernhard F, Verleysdonk S, Buadze M, Lourhmati A, Klopfer T, Schaumann F, Schmid B, Koehle C, Proksch B, Weissert R, Reichardt HM, Brandt JVD, Buniatian GH, Schwab M, Gleiter CH, Frey WH. 2011. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of parkinson disease. *Rejuvenation Res* 14 (1): 3-16.
- Djuwantono T, Wirakusumah FF, Achmad TH, Sandra F, Halim D, Faried A. 2011. A comparison of cryopreservation methods: Slow-cooling vs rapid-cooling based on cell viability, oxidative stress, apoptosis, and CD34 + enumeration of human umbilical cord blood mononucleated cells. *BMC Res Notes* 4 (371): 1-9.
- Dominici M, Blanc KL, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4): 315-317.
- Faiella W, Atoui R. 2016. Immunotolerant properties of mesenchymal stem cells: Updated review. *Stem Cells Int*. DOI: 10.1155/2016/1859567.
- Feyen DAM, Van Den Akker F, Noort W, Chamuleau SAJ, Doevendans PA, Sluijter JPG. 2016. Isolation of pig bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. DOI: 10.1007/978-1-4939-3584-0_12.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissue. *Transplantation* 17 (4): 331-340.
- Groza I, Pop R, Cenuariu M, Ciupe S, Pall E. 2016. Canine wharton's jelly derived mesenchymal stem cells isolation. *Agric Agric Sci Proc* 10: 408-411.
- Guan M, Xu Y, Wang W, Lin S. 2014. Differentiation into neurons of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Eur Cytokine Netw* 25 (3): 58-63.
- Guerrouahen BS, Sidahmed H, Sulaiti AA, Khulaifi MA, Cugno C. 2019. Enhancing mesenchymal stromal cell immunomodulation for treating conditions influenced by the immune system. *Stem Cells Int*. DOI: 10.1155/2019/7219297.
- Gunawan G, Dalhar M, Kurniawan SN. 2017. Parkinson dan terapi stem cell. *Malang Neurol J*. 3 (1): 39-46.
- Halim D. 2010. *Stem Cell-Dasar Teori dan Aplikasi Klinis*. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Handajani A, Roosierhmatie B, Maryani H. 2010. Faktor-faktor yang berhubungan dengan pola kematian pada penyakit degeneratif di Indonesia. *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan* 13 (1): 42-53.
- Hartono B. 2016. Sel Punca: Karakteristik, Potensi dan Aplikasinya. *Jurnal Kedokteran Meditek* 22 (60): 72-75.
- Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T. 2015. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Transl* 3: 26-33.
- Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. 2015. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Transl*. DOI: 10.1016/j.jot.2014.07.005.
- Jujo K, Li M, Losordo D. 2009. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 45 (4): 530-544.
- Labusca L, Herea DD, Mashayekhi K. 2018. Stem cells as delivery vehicles for regenerative medicine-challenges and perspectives. *World J Stem Cells* 10 (5): 43-56.
- Laverdet B, Micallef L, Lebreton C, Mollard J, Lataillade JJ, Coulomb B, Desmouliere A. 2014. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol Biol* 62 (2): 108-117.
- Lee MS, Makkar RR. 2004. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: A status report. *Ann Intern Med* 140 (9): 729-738.
- Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. 2010. A long term follow up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* 28 (6): 1099-1106.
- Liu H, Wei L-K, Jian X-F, Huang J, Zou H, Zhang S-Z, Yuan G-H. 2018. Isolation, culture and induced differentiation of rabbit mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Exp Ther Med J* 15: 3715-3724.
- Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, Sanz A, Remacha AR, Bolea R, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I. 2012. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res*. DOI: 10.1186/1746-6148-8-169.
- Novotny NM, Ray R, Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Wang Y, Meldrum DR. 2008. Stem cell therapy in myocardial repair and remodeling. *J Am Coll Surg* 207 (3): 423-434.
- Pawitan JA, Liem IK, Suryani D, Bustami A, Purwoko RY. 2013. Simple lipoaspirate washing using a coffee filter. *Asian Biomed* 7 (3): 333-338.
- Pösel C, Möller K, Fröhlich W, Schulz I, Boltze J, Wagner DC. 2012. Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0050293.
- Rantam F. 2009. *Stem Cell Exploration Method of Isolation and Culture*. 1st Edition. Airlangga University Press, Surabaya.
- Rinendyaputri R, Noviantari A. 2015. Produksi mesenchymal stem cell (MSC) dari sumsum tulang belakang mencit. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* 4 (1): 33-41.
- Rinendyaputri R, Dany F, Polim A, Boediono A. 2017. Vitrification method efficacy of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from Wharton's jelly. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* 6 (1): 9-19.
- Rinendyaputri R, Dany F, Nikmah UA. 2018. Efek dimethyl sulfoxide (DMSO) terhadap karakteristik sel punca limbal (SPL) tikus. *Indon J Med Sci* 5 (1): 1-6.
- Sangeetha P, Maiti SK, Mohan D, Shivaraju S, Raguvanan R, Rafee MA, Bindhuja BV, Kumar N, Raguvanshi PDS. 2017. Mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow (rBM MSC): Techniques for isolation, expansion and differentiation. *J Stem Cell Res Ther* 3 (3): 272-277.
- Santoso T, Irawan C, Alwi I, Aziz A, Kosasih A, Inggriani S, Saputra A, Wintery M, Lison L. 2011. Safety and feasibility of combined granulocyte colony stimulating factor and erythropoietin based-stem cell therapy using intracoronary infusion of peripheral blood stem cells in patients with recent anterior myocardial infarction: One-year follow-Up of a phase I study. *Indones J Intern Med* 43 (2): 112-121.
- Singh MR. 2016. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Bio*. DOI:10.1155/2016/6940283.
- Soleimani M, Nadri S. 2009. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc* 4 (1): 102-106.
- Sun Q, Zhang Z, Sun Z. 2014. The potential and challenges of using stem cells for cardiovascular repair and regeneration. *Genes Dis* 1 (1): 113-119.
- Taran R, Mamidi MK, Singh G, Dutta S, Parhar IS, John JP, Bhonde R, Pal R, Das AK. 2014. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci* 39: 157-169.
- Tursina A. 2019. Terapi transplantasi sel punca sebagai upaya pelayanan kesehatan di Indonesia dalam perspektif hukum kesehatan dan hukum islam. *Aktualita* 2 (1): 59-86.
- Wang Q, Sjoquist P. 2006. Myocardial regeneration with stem cells: Pharmacological possibilities for efficacy enhancement. *Pharmacol Res* 53: 331-340.
- Zainuri M, Putri RR, Bachtiar EW. 2018. Establishing methods for isolation of stem cells from human exfoliated deciduous from carious deciduous teeth. *Interv Med Appl Sci* 10 (1): 33-37.
- Zakariya H, Agung P. 2018. Peran mesenchymal stem cells dalam regulasi PDGF dan sel islet pada diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 30 (2): 98-102.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. 2019. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 10 (68): 1-22.