SKRIPSI

PENGARUH KONDISI FISIOLOGIS KULTUR TERHADAP JUMLAH SEL PUNCA MESENKIMAL PADA PASASE 6-9

GALUH RISMAWAN

200211771004

PROGRAM STUDI FARMASI

UNIVERSITAS GLOBAL JAKARTA

DEPOK

2023

HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Galuh Rismawan
NIM : 200211771004
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh Perbedaan Kondisi Fisiologis Kultur Terhadap Sel Punca Mesenkimal Pada Pasase 6-9

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Strata-1 Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Global Jakarta.

DEWAN PEMBIMBING

Pembimbing 1 : Dewi Rahmawati, S.Farm., M.Farm.



Pembimbing 2 : apt. Rizky farmasita B S.farm., M.Farm



Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 25 Novcmber 2022

KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Jurusan Farmasi pada Fakultas Farmasi. Saya menyadari tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah subhanahu wa ta'la atas nikmat sehat dan waktu luang sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi.
2. Orang tua, Istri dan anak-anak tersayang yang sudah memberikan do'a, bantuan, semangat yang tiada henti untuk penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan tepat waktu
3. Bapak Prof. Dr. apt. Eddy Yusuf, M.Pharm, selaku Rektor Universitas Global Jakarta, yang telah memberikan banyak pengetahuan dan pengalaman berharga.
4. Apt. Rizky Farmasita B, S.Farm.,M.Farm , selaku dosen pembimbing 1 dan Ibu Dewi Rahmawati S.Farm., M.Farm., selaku dosen pembimbing 2 yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam menyusun skripsi ini;
5. Alhara Yuwanda S.Si.,M.Ssi., M.Farm, Bapak Benny Efendie, B.Pharm., RPh, M.ClinPharm , Ibu Nopratilova, B.Pharm., M.ClinPharm, Ibu apt. Ahda Sabila E. Y, B.Pharm., M.ClinPharm , selaku dosen Farmasi Universitas Global Jakarta yang telah memberikan banyak ilmunya untuk penulis.
6. Segenap sivitas akademika Jurusan Farmasi, terutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
7. Teman-teman yang senantiasa memberikan doa serta restunya kepada penulis selama ini.

Jakarta, 10 November 2022
Penulis

ABSTRAK

Farmasi memiliki keterkaitan yang erat dengan ilmu biologi terlebih lagi tentang sel, Penelitian obat baru di bidang farmasi terjadi perkembangan yang pesat. Melalui perkembangan ilmu biologi inilah dicoba melakukan pemanfaatan dalam bentuk rekayasa genetik dan perkembangan sistem biologi sehingga menemukan inovasi-inovasi baru. Perkembangan pengobatan terbaru salah satunya adalah dengan cara melakukan pemahaman terhadap komposisi dan cara untuk membentuk sel menjadi zat yang bisa bermanfaat bagi tubuh. Terapi berbasis sel menjadi salah satu pengobatan yang paling banyak dilakukan riset dan diyakini mempunyai potensi sebagai obat masa depan. Sel punca mesenkimal adalah sel punca dewasa yang belum berdiferensiasi, ditemukan pada sumsum tulang belakang, darah maupun tali pusar. Sel punca mesenkimal merupakan jenis sel punca yang paling banyak digunakan dalam terapi sel, karena fungsinya yang sangat banyak dan juga sumber dari sel punca ini bisa di dapat tanpa pertentangan kode etik kedokteran yang berlaku di beberapa negara. Banyak faktor yang membuat kultur sel punca mesenkimal tidak berkembang dengan baik, salah satunya kondisi fisiologis kultur dapat menyebabkan hasil sel yang dikultur tidak berkembang dengan baik. Oleh karena itu perlu dilakukan perbandingan teknik kultur sel dan jumlah sel yang diperoleh dengan kondisi fisiologis inkubasi yang memiliki kelembaban tinggi dengan kondisi fisiologis kultur dengan kondisi inkubasi kelembaban rendah untuk bisa membandingkan pengaruh proliferasi dari sel punca mesenkimal.

Kata kunci: Sel Punca, Mesenkimal, Kultur sel, Teknik Aseptik, Produksi Steril

ABSTRACT

Pharmacy has a close relationship with biological sciences, especially about cells. Research on new drugs in the pharmaceutical field is developing rapidly. Through the development of biological sciences, it is tried to make use of it in the form of genetic engineering and the development of biological systems so as to find new innovations. One of the latest developments in medicine is to understand the composition and ways to shape cells into substances that can be beneficial for the body. Cell-based therapy is one of the most researched treatments and is believed to have potential as a drug of the future. Mesenchymal stem cells are undifferentiated adult stem cells, found in the spinal cord, blood and umbilical cord. Mesenchymal stem cells are the type of stem cells that are most widely used in cell therapy, because of their many functions and also the source of these stem cells can be obtained without conflicting medical ethics codes that apply in several countries. Many factors make mesenchymal stem cell cultures do not develop properly, one of which is the physiological conditions of the culture that can cause the cultured cells to not develop properly. Therefore, it is necessary to compare the cell culture technique and the number of cells obtained withhigh humidity physiological culture conditions with low Humidity culture physiological conditions to be able to compare the effect of proliferation of mesenchymal stem cells.

***Keyword**: Stem Cell, Mesenchymal, Cell Culture, Aseptic Technique, Sterile Production*

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING i
HALAMAN PENGESAHAN DEWAN PENGUJI ii
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI iii
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI AKADEMIS iv
KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH v
ABSTRAK vi
ABSTRACT vii
DAFTAR ISI viii
DAFTAR TABEL x
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR LAMPIRAN xii
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Tujuan Penelitian 4
1.4 Manfaat Penelitian 5
BAB II KAJIAN PUSTAKA 6
2.1 Landasan Teori 6
2.1.1 Mesenchymal Stem Cell 6
2.1.2 Karakteristik 6
2.1.3 Human Mesenchymal Stem Cell (h-MSC) 7
2.1.4 Kultur Sel Punca Mesenkimal secara In Vitro 7
2.1.5 Pasase Sel punca 9
2.1.6 Tripsinasi 9
2.1.7 Human Platelet lysate Minimum Esensisal medium 10
2.1.8 (MEM) Minimum Esensial Medium 11
2.1.9 Phosphate Buffer Saline (PBS) 11
2.1.10 Pertumbuhan Sel dan Viabilitas Sel 11
2.1.11 Molekul Proliferasi 12
2.1.12 Inkubator 12
2.1.13 Biological Safety Cabinet (BSC) 13
2.1.14 Gowning 14
2.1.15 Environment Monitoring 15
2.1.16 Thawing and Seeding P6.01 17
2.2 Tinjauan Penelitian Yang Berkaitan 17
2.3 Rumusan Hipotesis 18
BAB III METODOLOGI PENELITIAN 16
3.1 Kerangka Pemikiran 16
3.2 Alur Penelitian 17
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian 18
3.4 Alat dan Bahan 18
3.5 Metodologi Penelitian 18
3.6 Sampel 18
3.7 Pembuatan Media 18
3.8 Pembuatan Larutan Tripsinasi 19
3.9 Pembuatan Larutan Pencucian sel 19

3.10 Prosedur Penelitian 19
3.11 Cara Pengolahan dan Analisis Data 24
BAB IV HASIL 30
4.1 Thawing dan Seeding 30
4.2 Pergantian Media hari ke-4 dan pasase 7 hari ke-7 30
4.3 Pergantian Media hari ke-10 dan pasase 8 hari ke-13 31
4.4 Pergantian Media hari ke-16 dan pasase 9 hari ke-19 31
4.5 Pergantian Media hari ke-22 dan Harvest hari ke-26 32
BAB V PEMBAHASAN 36
5.1 Hasil Perhitungan Total sel 36
5.2 Total Sel, Viabilitas dan Kelemembaban Hasil Penelitian Tc Dish A dan B 38
BAB VI PENUTUP ..... **Error! Bookmark not defined.**
6.1 Kesimpulan 41
6.2 Saran 41
DAFTAR PUSTAKA 42
LAMPIRAN-LAMPIRAN 46

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Klasifikasi Ruang Bersih Berdasarkan Jumlah Partikel 16
Tabel 2.2 Batas Cemaran Mikroba dalam Pemantauan Area Bersih On Process 16
Tabel 4.1 Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Thawing 30
Tabel 4.2 Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Pasase 7 30
Tabel 4.3 Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Pasase 8 31
Tabel 4.4 Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Pasase 9 32
Tabel 4.5 Jumlah Sel, Viabilitas Sel Hasil Panen Sel SPM Pasase 9..... 32
Tabel 5.1 Grafik Total Sel, Viabilitas dan Kelemembaban Hasil Penelitian Tc Dish A dan B 38

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Sumber Utama Human Mesenchymal Stem Cell (h-MSC) (Hass, 2011)..... 7
Gambar 2.2 Kultur sel primer dan subkultur. (Agung P,2019)..... 8
Gambar 2.3 Disosiasi sel dengan trypsin. (Motyam JA, 2013)..... 10
Gambar 2.4 Inkubator thermal (Cappuccino & Sherman, 2001)..... 13
Gambar 3.1 Kerangka Pemikiran..... 16
Gambar 3.2 Alur Penelitian 17

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Tanaman 46
Lampiran 2. Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Thawing ... 47
Lampiran 3. Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Pasase 7 ... 47
Lampiran 4. Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Pasase 8 ... 47
Lampiran 5. Jumlah Sel, Viabilitas Sel, Seeding Sel Hasil Kultur Sel SPM Pasase 9 ... 47
Lampiran 6. Jumlah Sel, Viabilitas Sel Hasil Panen Sel SPM Pasase 9 47
Lampiran 7. Hasil Thawing pasase 6 48
Lampiran 8. Perhitungan pasase 7 sampel A 48
Lampiran 9. Perhitungan pasase 7 sampel B 49
Lampiran 10. Perhitungan pasase 8 sampel A dan B 49
Lampiran 11. Perhitungan pasase 9 sampel A dan B 50
Lampiran 12. Perhitungan harvest sampel A dan B 51
Lampiran 13. Dokumentasi 52

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sel punca mesenkimal dewasa (MSC) terdiri dari populasi sel unik yang pertama kali dijelaskan pada tahun 1970 oleh Friedenstein et al. Penelitian dimulai dari MSC dewasa yang diturunkan dari sumsum tulang dalam serangkaian penelitian pada hewan, kemudian sel induk embrionik manusia pada tahun 1998 adalah peristiwa pertama di bidang penelitian sel induk manusia (Friedenstein et al., 1970) (M.F. Pittenge et al., 1999). MSC adalah jenis sel punca yang paling banyak dipelajari dan dipahami dengan baik. Banyak penelitian berfokus pada kemampuan unik sel punca untuk waktu yang tidak terbatas dalam memperbaharui diri, berdiferensiasi menjadi beberapa garis keturunan sel, dan membentuk klonal populasi sel. Karakteristik yang menentukan ini telah menghasilkan banyak hal kegembiraan untuk penggunaan lini sel ini untuk aplikasi terapeutik klini saat ini.

Banyak studi yang dilakukan untuk memahami sifat dan perkembangan populasi sel punca yang sulit dipahami. Hasil yang menjanjikan dari studi praklinis tentang penggunaan MSC untuk perbaikan tulang dan tulang rawan (K. Tateishi et al.,2007)(R. Cancedda et al., 2003). dengan cepat dan uji klinis menggunakan MSC untuk mengobati cacat tulang besar (R. Quarto et al., 2001) artikular defek kartilago (S. Wakitan., 2001) osteogenesis imperfekta (E.M. Horwitz et al., 2001; K. Le Blanc et al., 2005) dan uji coba sejauh ini mengkonfirmasi hasil menarik dari penelitian pada hewan, dan tentu potensi terapeutik MSC untuk manusia. Penelitian sel punca terus dikembangkan untuk berbagai jenis terapi penyakit, khususnya penyakit degeneratif, hingga kini banyak negara di dunia telah menggunakan terapi sel punca sebagai pilihan pengobatan bagi penyakit kelainan hematologi maupun penyakit degeneratif (Rosenstrauch et al, 2005).

Penyebab penyakit degenaratif telah diketahui akibat kerusakan sel-sel di dalam jaringan organ, sehingga jaringan atau organ tersebut tidak lagi berfungsi sesuai dengan kebutuhan tubuh. Kerusakan sel pada penyakit degeratif nersifat irreversible, sehingga obat-obatan yang tersedia pada saat ini hanya dapat memperlambat atau mencegah terjadinya kerusakan yang lebih luas. Selama ini penggantian kompone organ atau jaringan yang rusak tersebut dengan organ atau jaringan yang baru yang masih berfungsi optimal merupakan jalan satu-satunya yang harus ditempuh. Bedasarkan hal inilah para

ahli berpikir bahwa di masa yang akan datang sel punca dapat dijadikan tumpuan terapi di bidang kesehatan. (Hanabusa et al, 2005; Safitri E, 2019; Kaczmarczyk K, 2008).

Sifat unik Sel punca mesenkimal menjadikannya ideal pembawa untuk pengiriman obat kimia yang ditargetkan (Bonomi et al., 2015), gen terapeutik (Chen et al., 2017), dan nanopartikel pencitraan (NP) (Kidd et al., 2009) untuk pengobatan dan diagnosis berbagai penyakit, seperti tumor (Amara et al., 2016) , paru akut cedera (Yang et al., 2015), cedera ginjal akut (Wang et al., 2016), dan infark miokard (Luger et al., 2017). Disisi lain hal yang sangat menarik dari MSC adalah kapasitas homing mereka, memungkinkan sel dinavigasi menuju lokasi cedera dan peradangan (Kidd et al., 2009). Beberapa penelitian sebelumnya telah mengkonfirmasi MSC yang diberikan secara eksogen dapat ditemukan pada jaringan yang rusak (Neuhuber et al., 2005; Sasaki et al., 2008; Satake et al., 2004; Wang et al., 2013). Sel punca mesenkimal menciptakan lingkungan mikro di lokasi tumor yang memiliki ciri molekuler dari jaringan yang rusak (Nwabo Kamdje et al., 2017).

Kompartemen seluler MSC memungkinkan untuk menyimpan obat di dalam sitoplasma. Beberapa penelitian telah mengkonfirmasi bahwa obat-obatan (bahan kimia dan gen terapeutik) dapat diinternalisasi oleh MSC, terutama melalui mekanisme pinositik seperti endositosis melalui caveolae, serta makropinositosis, atau dengan mekanisme pinositik alternatif lainnya (Conner dan Schmid, 2003). Dalam studi resistensi toksisitas, MSC menunjukkan hasil yang tinggiresistensi terhadap paclitaxel (PTX) yang dimuat secara internal (Bonomi et al., 2015). Doxorubicin (DOX) juga berhasil dimuat dalam MSC, yang menargetkan pengirimannya ke lokasi tumor baik in vivo maupun in vitro (Kalimuthu et al., 2018) MSC juga dapat membawa dan melindungi gen terapeutik melalui rekombinasi gen, dan mencapai efek terapeutik dengan memfasilitasi ekspresi fungsional tertentu protein dalam jaringan sasaran. Sek punca mesenkimal telah menunjukkan potensinya dengan memuat gen bunuh diri, yang dapat mengekspresikan enzim di lokasi tumor selektif untuk mengubah siklofosfamid menjadi komponen sitotoksiknya eliminasi tumor selektif (Amara et al., 2016).

Perkembangan penelitian sel punca di Indonesia untuk penggunaan terapi sudah semakin maju. Walaupun pemanfaatan sel punca sebagai Drug Delivery system masih dalam tahap awal riset tetapi penggunaan sel punca mesenkimal secara langsung sudah mulai diterapkan dalam terapi sel punca berbasis riset. Bedasarkan Permenkes No.32

tahun 2014, terdapat 11 rumah sakit yang ditunjuk menjadi tempat pelayanan terapi sel punca di Indonesia, yaitu RSUP dr. Cipto Mangunkusumo (Jakarta), RSUD dr. Sutomo (Surabaya), RSUP dr M. Djamil (Padang), RS Jantung dan Pembuluh Darah (Jakarta), RSUP Fatmawati (Jakarta), RS Kanker Dharmais (Jakarta), RSUP Persahabatan (Jakarta), RSUP dr. Hasan Sadikin (Bandung), RSUP dr Sardjito (Jogjakarta), RSUP dr.Karyadi (Semarang) RSUP Sanglah (Bali). Rumah sakit tersebut harus memiliki fasilitas instalasi sel punca, bank sel punca, riset terpadu, hingga tenaga medis yang memiliki keahlian di bidang sel punca. Adapun pengolahan sel punca boleh dilakukan di dalam maupun diluar rumah sakit. Oleh karena dengan banyaknya pemanfaatan sel punca di dunia kesehatan, penelitian teknik kultur sel punca yang semakin baik perlu dilakuan untuk mendapatkan hasil panen sel punca yang bisa digunakan untuk terapi khususnya yang berhubungan dengan hasil panen kultur sel punca.

Pertumbuhan sel yang sempurna membutuhkan kondisi tertentu guna mempertahankan keberlangsungan fungsi metabolisme dan biologik sel secara stabil baik pada kultur primer maupun *cell linecontinous*. Hal ini dilakukan dengan cara meniru kondisi fisiologis jaringan in-vivo yang kemudian diaplikasikan dalam kultur sel. secara teoritisi faktor tersebut berupa substrat atau medium yang menyediakan nutrisi baik asam amino, karbohidrat, vitamin dan mineral di samping nutrient essential berupa growth factor dan hormonal. Faktor lain yang juga penting dalam menunjang kultur sel adalah konsentrasi O2 dan atau CO2, di samping lingkungan psikokimia, berupa pH, tekanan osmotik dan temperature.(Agung P,2019)

Secara spesifik semua faktor yang mempengaruhi kondisi optimal sel kultur dapat dibagi menjadi 2, yaitu kondisi fisiologis kultur dan lingkungan mikroseluler kultur. Kondisi fisiologi kultur adalah kondisi kultur yang telah disesuaikan dengan kondisi in-vivo, sehingga sel kultur dapat beradaptasi dengan baik pada kondisi tersebut. Lingkungan mikroseluler kultur adalah kondisi lingkungan sekitar (niche) sel kultur berupa substratum yang menyerupai keadaan jaringan in-vivo. (Agung P, 2019). Kondisi fisiologis yang bisa mempengaruhi kultur sel memiliki 4 faktor, diantaranya suhu, PH, osmolaritas dan tekanan CO2. Sedangkan kondisi yang dapat mempengaruhi lingkungan mikroseluler kultur memiliki 2 faktor yaitu disk kultur dan media kultur. Rentannya kondisi sel yang akan rusak apabila faktor-faktor tersebut mengalami kondisi yang tidak ideal, salah satunya dengan inkubator yang kelembabannya dikurangi atau dihilangkan. (Agung P, 2019)

Dengan hilangnya kelembaban di dalam inkubator, faktor-faktor lain pun ikut bermasalah, contoh faktor osmolaritas dan PH akan ikut terpengaruh dan bisa menyebabkan pertumbuhan sel terhambat dan jumlah sel yang diharapkan tumbuh akan mengalami penurunan. Peningkatan tekanan osmotik menyebabkan air keluar dari dalam sel, sehingga pengendalian tekanan osmotik dan konsentrasi garam perlu dilakukan agar tetap pada kadar optimal bagi pertumbuhan sel.(Wei d et al., 2013). Berdasarkan hal tersebut untuk memperoleh hasil kultur sel punca dengan berbagai kondisi sangat penting, mengingat penelitian terapi sel punca mesenkimal sudah mulai berkembang, data-data yang ada diperlukan agar produksi sel punca mesenkimal bisa dapat standarisasi, dengan aturan yang ketat yang telah pemerintah lakukan dalam terapi sel berbasis sel punca mesenkimal, maka diperlukan pengetahuan perbandingan jumlah sel punca mesenkimal yang diperoleh antara inkubator yang ideal dengan inkubator yang mengalami penurunan kelembaban.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas maka dapat dirumuskan suatu permasalahan bagaimana pertumbuhan kultur sel punca dengan kondisi fisiologis Inkubasi kelembaban tinggi dibandingkan inkubasi kelembaban rendah.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki 2 tujuan, yaitu tujuan umum dan tujuan khusus.

1.3.1 Tujuan Umum

Pertumbuahan sel punca Mesenkimal dipengaruhi banyak oleh kondisi fisiologis kultur sel punca, dengan merubah salah satu faktor dapat mempengaruhi jumlah sel yang didapatkan saat proses kultur sel punca.

1.3.2 Tujuan Khusus

a. Mengetahui jumlah sel hasil pertumbuhan kultur sel punca dengan inkubasi kelembaban tinggi.
b. Untuk menetahui jumlah sel hasil pertumbuhan sel punca dengan inkubasi kelembaban rendah.
c. Untuk mengetahui perbandingan jumlah sel yang diperoleh dengan metode inkubasi kelembaban tinggi dan rendah.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi:

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut.
2. Penelitian ini diharapkan menambah pengetahuan peneliti tentang cara pembuatan Skripsi yang baik dan benar serta menambah pengetahuan tentang pengaruh metode inkubasi kultur sel punca.
3. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai bahan untuk perbandingan riset pertumbuhan sel punca dengan metode mempengaruhi kondisi fisiologis kultur sel punca dalam hal ini perbedaan kelembaban saat proses inkubasi.

DAFTAR PUSTAKA

Ando, W., Tateishi, K., Hart, D. A., Katakai, D., Tanaka, Y., Nakata, K., Hashimoto, J., Fujie, H., Shino, K., Yoshikawa, H., & Nakamura, N. (2007). Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials, 28*(36), 5462-5470.

Butler, M. (2004). *Animal cell culture and technology*. (2nd ed.). BIOS Scientific Publishers.

Cancedda, R., Mastrogiacomo, M., Bianchi, G., Derubeis, A., Muraglia, A., & Quarto, R. (2003). Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Foundation Symposium*, 249, 133-143.

Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2001). *Microbiology laboratory manual*. Rockland Community College, State University of New York.

Carvalho, P. P., Gimble, J. M., Dias, I. R., Gomes, M. E., & Reis, R. L. (2010). Human adipose-derived stromal/stem cells: Use of animal-free products and extended storage at room temperature. *Stem Cells, 2*(3), 1-3.

Cheng, H., Kastrup, C. J., Ramanathan, R., Siegwart, D. J., Ma, M., Bogatyrev, S. R., Xu, Q., Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2010). Nanoparticulate cellular patches for cell-mediated tumoritropic delivery. *ACS Nano, 4*(2), 625-631.

Chen, Y., Zhao, Y., Chen, W., Xie, L., Zhao, Z. A., Yang, J., Chen, Y., Lei, W., & Shen, Z. (2017). MicroRNA-133 overexpression promotes the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells on acute myocardial infarction. *Stem Cell Research & Therapy, 8*(1), 268.

Cournil-Henrionnet, C., Huselstein, C., Wang, Y., Galois, L., Mainard, D., Decot, V., Netter, P., Stoltz, J. F., Muller, S., Gillet, P., & Watrin-Pinzano, A. (2008). Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion. *Biorheology, 45*(3-4), 513-526.

Djuwita, I. (2002). *Modul pemanfaatan teknik kultur jaringan dan histokimia dalam penelitian dan terapan bidang biologis dan medis*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi dan Institut Pertanian Bogor.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy, 8*(4), 315-317.

Durante, C., Agostini, F., Abbruzzese, L., Toffola, R. T., Zanolin, S., Suine, C., & Mazzucato, M. (2013). Growth factor release from platelet concentrates: Analytic quantification and characterization for clinical applications. *Vox Sanguinis, 105*(2), 129-136.

Fedik, A. R., Ferdiansyah, & Purwati. (2014). *Stem Cell, Mesenchymal, Hematopoietik Dan Model Aplikasi*. (2nd ed.). Airlangga University Press.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetetics, 3*(4), 393-403.

Ferrua, C., Centeno, E., Rosa, L., et al. (2017). How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. *Brazilian Oral Research, 31*, e59.

Gibco. (2011). *Cell culture basics*. www.invitrogen.com.

Goel, R., Ness, P. M., Takemoto, C. M., Krishnamurti, L., King, K. E., & Tobian, A. A. (2015). Platelet transfusions in platelet consumptive disorders are associated with arterial thrombosis and in-hospital mortality. *Blood, 125*(9), 1470-1476.

Grajek, W., & Olejnik, A. (2004). Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 13*(54), 5-24.

Griffiths, J. B. (1986). Scaling-up of animal cell cultures. In R. I. Freshney (Ed.), *Animal cell culture* (pp. 36-69). IRL Press.

Hanabusa, K., Nagaya, N., Iwase, T., Itoh, T., Murakami, S., Shimizu, Y., & Kangawa, K. (2005). Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke, 36*(4), 853-858.

Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling, 9*(1), 12.

Hemeda, H., Giebel, B., & Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy, 16*(2), 170-180.

Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L., & Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 99*(13), 8932-8937.

Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E., & Brenner, M. K. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine, 5*(3), 309-313.

Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Gordon, P. L., Koo, W. W., Fitzpatrick, L. A., Neel, M. D., McCarville, M. E., Orchard, P. J., Pyeritz, R. E., & Brenner, M. K. (2001). Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood, 97*(5), 1227-1231.

Imannuddin, F. R. (2011). Kombinasi pemberian TGF-β1, GM-CSF, Activin-A meningkatkan kadar IL-12 dan interferon gamma sebagai indikator pertumbuhan sel Langerhans kulit dalam kultur biakan DMEM sel punca. *Master's thesis*. Program Magister Program Studi Biomedik.

Jusuf, A. A. (2008). Aspek dasar sel punca embrionik (Embryonic Stem Cells) dan potensi pengembangannya. *Conference presentation*. Diskusi Panel: Realitas Baru dan Prospek Perkembangan Seputar Terapi Sel Punca (Stem Cell).

Kaczmarczyk, K. (2008). Is the clinical use of adult stem cells a realistic possibility for myocardial regeneration? *Bioscience Horizons, 1*(1), 67-74.

Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J. L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V. L., Weil, M., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells, 27*(10), 2614-2623.

Kobayashi, J., & Okano, T. (2010). Fabrication of a thermoresponsive cell culture dish: A key technology for cell sheet tissue engineering. *Science and Technology of Advanced Materials, 11*(1), 014111.

Kurashina, Y., Imashiro, C., Hirano, M., et al. (2019). Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic traveling waves. *Communications Biology, 2*(1), 393.

Le Blanc, K., Gotherstrom, C., Ringden, O., Hassan, M., McMahon, R., Horwitz, E., Anneren, G., Axelsson, O., Nunn, J., Ewald, U., Norden-Lindeberg, S., Jansson, M., Dalton, A., Astrom, E., & Westgren, M. (2005). Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation, 79*(11), 1607-1614.

Lechanteur, C., Briquet, A., Giet, O., Delloye, O., Baudoux, E., & Beguin, Y. (2016). Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: A large banking experience. *Journal of Translational Medicine, 14*(1), 1-15.

Miersch, C., Stange, K., & Röntgen, M. (2018). Effects of trypsinization and of a combined trypsin, collagenase, and DNase digestion on liberation and in vitro function of satellite cells isolated from juvenile porcine muscles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 54*(5), 406-412.

Mothersill, C., & Austin, B. (2003). *In vitro methods in aquatic toxicology*. Praxis Publishing.

Motyan, J. A., Toth, F., & Tozser, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules, 3*(4), 923-942.

Nazaroff, I., Lee, J., Soupene, E., Etemad, S., Knapik, D., & Green, W. (2012). Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. *Stem Cells Translational Medicine, 1*(5), 359-372.

Neuhuber, B., Himes, B. T., Shumsky, J. S., Gallo, G., & Fischer, I. (2005). Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Research, 1035*(1), 73-85.

Nwabo Kamdje, A. H., Kamga, P. T., Simo, R. T., Vecchio, L., Seke Etet, P. F., Muller, J. M., Bassi, G., Lukong, E., Goel, R. K., Amvene, J. M., & Krampera, M. (2017). Mesenchymal stromal cells' role in tumor microenvironment: Involvement of signaling pathways. *Cancer Biology & Medicine, 14*(2), 129-141.

Part, P., Norrgren, L., Bergstrom, E., & Sjoberg, P. (1993). Primary cultures of epithelial cells from rainbow trout gills. J*ournal of Experimental Biology, 175*(1), 219-232.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science, 284*(5411), 143-147.

Potter, S. M., & DeMarse, T. B. (2001). A new approach to neural cell culture for long-term studies. J*ournal of Neuroscience Methods, 110*(1-2), 17-24.

Putra, A. (2019). *Basic molecular stem cell*. Unissula Press.

Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New England Journal of Medicine, 344*(5), 385-386.

Rantam, F., et al. (2009). *Stem cell exploration: Method of isolation and culture*. (1st ed.). Airlangga University Press.

Rikno, H. (2018). Tanaman sebagai bioreaktor protein farmaseutik. *BioTrends, 9*(1), 25-34.

Rosenstrauch, D., Ponglajen, G., Zidar, N., & Gregoric, I. (2005). Stem cell therapy for ischemic heart failure. *Texas Heart Institute Journal, 32*(3), 339-347.

Safitri, E. (2019). Comparison of biotechnological culture of hypoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells with conventional in vitro culture of normoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells for testicular failure therapy with low libido in rats. *Veterinary World, 12*(6), 916-923.

Salzig, D. (2013). Enzymatic detachment of therapeutic mesenchymal stromal cells grown on glass carriers in a bioreactor. *Open Biomedical Engineering Journal, 7*(1), 147-158.

Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., & Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology, 180*(4), 2581-2587.

Satake, K., Lou, J., & Lenke, L. G. (2004). Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine, 29*(18), 1971-1979.

Suhardi, S. H., et al. (2008). *Biosafety: Pedoman keselamatan kerja di laboratorium mikrobiologi dan rumah sakit*. PT Multazam Mitra Prima.

Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports, 35*(2), e00191.

Wakitani, S., et al. (2004). Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. *Cell Transplantation, 13*(5), 595-600.

Wei, X., et al. (2013). Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica, 34*(6), 747-754. https://doi.org/10.1038/aps.2013.50.