

MONOGRAF

**ISOLASI & KULTUR
SEL NON-ADHEREN UNTUK
PEMROGRAMAN ULANG SEL**

Pasal 113 Undang-undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta:

- (1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
- (2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/ atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- (3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/ atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- (4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

MONOGRAF

ISOLASI & KULTUR SEL NON-ADHEREN UNTUK PEMROGRAMAN ULANG SEL

Dr. ANDRIANTO, dr., Sp.JP(K)



Airlangga
University
Press

■ Pusat Penerbitan dan Percetakan
Universitas Airlangga

ISOLASI & KULTUR SEL NON-ADHEREN UNTUK PEMROGRAMAN ULANG SEL

Andrianto

ISBN 978-602-473-652-1

© 2020 Penerbit **Airlangga University Press**

Anggota IKAPI dan APPTI Jawa Timur
Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Telp. (031) 5992246, 5992247 Fax. (031) 5992248
E-mail: adm@aup.unair.ac.id

Layout (Djaiful)

Dicetak oleh:

Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR
AUP 1010/10.20 - OC316/10.20

Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang.
Dilarang mengutip dan/atau memperbanyak tanpa izin tertulis
dari Penerbit sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apa pun.

Prakata

Alhamdulillah, segala puji dan syukur tidak terhingga penulis panjatkan ke hadirat Allah swt., dengan terbitnya buku monograf yang berjudul “Isolasi dan Kultur Sel Non-Adheren untuk Pemrograman Ulang Sel”. Diketahui saat ini banyak dikembangkan mengenai pemrograman ulang sel (*cellular reprogramming*) untuk terapi berbasis sel pada berbagai penyakit degeneratif. Hal penting dalam mengawali pemrograman ulang sel adalah menentukan sumber sel, teknik isolasi, dan kultur sel.

Sel darah perifer menjadi salah satu sumber sel yang potensial digunakan untuk pemrograman ulang sel. Sel darah perifer termasuk jenis sel non-adheren yaitu sel yang tidak melekat dalam media kultur mengingat keberadaan sel yang banyak dalam sirkulasi. Masih belum

banyak referensi yang dapat digunakan sebagai panduan melakukan isolasi dan kultur sel tersebut secara efektif dan efisien.

Dalam buku monograf ini penulis memaparkan isolasi sel CD34+ dengan menggunakan teknik yang spesifik serta menggunakan beberapa media kultur sel non-adheren sehingga diperoleh pilihan teknik yang tepat.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih pada semua pihak yang telah membantu hingga terwujudnya buku ini. Kesempurnaan hanyalah milik Allah sehingga penulis sangat mengharapkan saran dan masukan untuk penyempurnaan buku ini.

Akhirnya, semoga buku ini bermanfaat bagi para pembaca dan peneliti dalam menambah wawasan serta dapat digunakan sebagai panduan dalam praktik isolasi dan kultur sel di laboratorium.

Penulis

Daftar Isi

Prakata	v
Daftar Gambar dan Tabel.....	ix
Daftar Singkatan	x
1 PENDAHULUAN	1
2 TERAPI REGENERATIF INFARK MIOKARD	5
Kardiomioplasti Seluler sebagai Modalitas Terapi Regeneratif Infark Miokard	5
Pemrograman Ulang <i>Stem Cell</i> sebagai Sumber Sel untuk Kardiomioplasti Seluler.....	8
<i>Stem Cell</i> Dewasa	11
<i>Stem Cell</i> Hematopoietik dari Darah Tepi	13

3	ISOLASI DAN KULTUR SEL	17
	Metode Isolasi Sel.....	17
	Media Tanam pada Kultur Sel.....	20
4	METODE ISOLASI DAN KULTUR CD34 DARAH TEPI	23
	Instrumen dan Bahan yang Digunakan untuk Isolasi & Kultur Sel CD34 Darah Tepi	23
	Koleksi Sampel Darah Tepi	24
	Proses <i>Pre-Enrichment</i> Sel CD34 ⁺ Darah Tepi.....	24
	Proses Isolasi Sel CD34 ⁺ dengan Metode Magnetik.....	25
	Ekspansi dan Pengamatan Kultur Sel CD34 ⁺ Darah Tepi ..	26
	Isolasi dan Identifikasi Sel CD34 ⁺ Darah Tepi	27
	Hasil Pengamatan Kultur Sel CD34 ⁺ Darah Tepi	30
5	KESIMPULAN	35
	Daftar Pustaka	37

Daftar Gambar dan Tabel

Gambar 1. Klasifikasi <i>stem cells</i> berdasarkan potensi diferensiasinya	9
Gambar 2. Prinsip metode FACS.....	19
Gambar 3. Prinsip metode MACS.....	20
Gambar 4. (A) Hasil sentrifugasi menggunakan metode <i>gradien Ficoll</i> (B) Isolasi sel CD34+ darah perifer dengan <i>Easy Sep Magnet</i> (C) Proses <i>seeding</i> sel CD34+ pada <i>well</i>	28
Gambar 5. Ekspresi CD34+ pada sel hasil isolasi.....	28
Tabel 1. Pengamatan kultur sel CD34+ darah tepi hari ke-0	31
Tabel 2. Pengamatan kultur sel CD34+ darah tepi hari ke-4	32
Tabel 3. Pengamatan kultur sel CD34+ darah tepi hari ke-7	32

Daftar Singkatan

PBMC	: <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PJK	: Penyakit jantung koroner
CD34	: <i>Cluster differentiation 34</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FACS	: <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
hESC	: <i>Human embryonic stem cell</i>
HLA-DR	: <i>Human leukocyte antigen-DR</i>
HSC	: <i>Hematopoietic stem cell</i>
iPSC	: <i>Induced pluripotent stem cell</i>
MACS	: <i>Magnetic-activated cell sorting</i>

1

Pendahuluan

Penyakit jantung koroner (PJK) hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan terbesar di dunia. Hal tersebut disebabkan karena PJK masih menduduki peringkat pertama penyebab kematian di dunia. Selain itu, PJK diprediksi akan tetap menjadi penyebab kematian nomor satu di dunia dengan jumlah kematian lebih dari 20 juta pada tahun 2030.¹ Hal yang sama juga terjadi di Indonesia di mana PJK juga menjadi penyebab kematian tertinggi. Selain itu, berbagai penyakit jantung akibat komplikasi dari PJK merupakan penyakit dengan jumlah pembiayaan tertinggi di Indonesia.²

Komplikasi utama dari PJK adalah kondisi kematian pada sel otot jantung (kardiomiosit) yang disebut dengan infark miokard. Hingga saat ini, tata laksana infark miokard yang dapat dilakukan terbatas pada mengembalikan aliran darah koroner ke daerah yang mati serta

mengurangi beban otot jantung menggunakan obat-obatan. Namun, tata laksana tersebut tidak dapat menggantikan kardiomyosit yang telah mati sehingga kontraksi jantung akan menurun. Penurunan kontraksi jantung yang terjadi dapat menyebabkan kondisi di mana jantung tidak mampu memompa darah ke organ-organ di seluruh tubuh, yang disebut dengan gagal jantung. Pasien dengan gagal jantung tingkat lanjut tidak memiliki pilihan terapi lain kecuali dengan transplantasi jantung. Transplantasi jantung merupakan tindakan yang masih sangat jarang dilakukan akibat adanya kendala pada keterbatasan donor dan kemungkinan adanya reaksi penolakan organ akibat mekanisme imun pada penerima donor.^{3,4}

Terapi alternatif dibutuhkan untuk mengatasi masalah tersebut, salah satunya adalah melalui regenerasi jaringan otot jantung (miokardium) yang telah mati menggunakan *stem cell*. Hal tersebut dapat dilakukan dengan teknik kardiomioplasti seluler.^{5,6} Kardiomioplasti seluler merupakan teknik penanaman sel pada daerah miokardium yang telah mati dan bertujuan untuk mengganti jaringan miokardium yang rusak serta mengembalikan fungsi miokardium.^{7,8}

Proses mendapatkan sumber sel untuk proses kardiomioplasti seluler masih menjadi tantangan hingga dewasa ini karena masih belum banyak studi mengenai hal ini. Salah satu teknik yang saat ini sedang berkembang adalah teknik pemrograman ulang atau transdiferensiasi. Pemrograman ulang sel adalah teknik konversi jenis sel dewasa tertentu menjadi sel yang lain. Teknik pemrograman ulang sel ini telah terbukti aman dan memiliki proses yang relatif sederhana.⁹

Keberhasilan proses pemrograman ulang sel dipengaruhi oleh jenis sel sumber. *Stem cell* hematopoietik yang memiliki penanda permukaan CD34+ memiliki potensi untuk menjadi sel sumber karena sel ini mampu untuk berdiferensiasi menjadi kardiomyosit.

Kemampuan diferensiasi sel CD34+ menjadi kardiomyosit disebabkan karena sel CD34+ berasal dari lapisan embrionik yang sama dengan organ jantung pada saat proses pembentukan organ embrio. Sel CD34+ dapat diambil dari darah tepi dalam jumlah besar melalui prosedur yang minimal invasif. Pengambilan darah tepi juga tidak menyebabkan kerugian kepada donor karena sel-sel yang diambil akan segera diganti secara alami oleh produksi dari sumsum tulang. Sebagai sel yang berada dalam darah tepi maka sel CD34+ ini memiliki sifat non-adherent yaitu sel yang tidak melekat dalam media tanam (kultur).¹⁰

Isolasi dan kultur sel CD34+ dari darah tepi merupakan proses krusial untuk mendapatkan sel CD34+ yang baik untuk proses modifikasi berikutnya. Metode isolasi yang tepat dan kondisi kultur yang sesuai akan menghasilkan efisiensi yang tinggi dalam proses modifikasi genetik atau perlakuan lain yang diberikan kepada sel CD34+. Metode isolasi magnetik merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk mengisolasi sel dengan jumlah yang minimal pada sirkulasi dengan selektivitas dan spesifitas yang cukup tinggi.¹¹

Selain metode isolasi sel, media tanam pada kultur sel CD34+ yang tepat juga diperlukan. Media tanam pada kultur sel akan memengaruhi adhesi, ketahanan, pembelahan, dan siklus sel sehingga media tanam kultur sel yang tepat diperlukan untuk menghasilkan kultur sel CD34+ yang baik dan sehat.¹² Sampai saat ini, belum ada metode dan pemilihan media tanam yang pasti untuk kultur sel CD34+ darah tepi.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode yang optimal untuk isolasi dan kultur sel CD34+ darah tepi menggunakan media tanam tertentu, yang akan digunakan untuk proses pemrograman ulang sel menjadi kardiomyosit. Secara spesifik, tujuan pada penelitian ini adalah mengetahui apakah isolasi magnetik dapat menghasilkan sel

CD34+ dari darah tepi. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk membandingkan beberapa media tanam kultur yaitu vitronektin, fibronektin dan plasma darah untuk adhesi sel CD34+ darah tepi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi rujukan metode dalam isolasi dan kultur sel CD34+ darah tepi yang akan digunakan pada proses pemrograman ulang sel menjadi kardiomyosit.

2

Terapi Regeneratif Infark Miokard

KARDIOMIOPLASTI SELULER SEBAGAI MODALITAS TERAPI REGENERATIF INFARK MIOKARD

Berbagai penyakit degeneratif dapat mengakibatkan kerusakan hingga di tingkat sel yang bersifat permanen. Terapi konvensional telah diketahui tidak dapat mengatasi kerusakan tersebut secara sempurna. Selama ini, terapi hanya berperan untuk menghambat progresivitas maupun mencegah kerusakan jaringan atau organ yang lebih luas. Oleh karena itu, peneliti dan klinisi telah mencari berbagai macam alternatif untuk menyelesaikan masalah tersebut, salah satunya melalui aplikasi klinis *stem cell* untuk terapi regeneratif.^{10,13}

Miokardium, yang terdiri atas banyak kardiomyosit, merupakan jenis sel yang sudah tidak dapat berdiferensiasi lagi. Studi terbaru menyatakan bahwa terdapat sistem perbaikan alamiah dari miosit

yang mengalami kerusakan, namun mekanisme itu tidak bekerja pada kerusakan sel yang lebih lanjut. Kardiomyosit dewasa mempunyai kapasitas untuk berdiferensiasi dan berproliferasi pada skala kecil yaitu 1% dari seluruh jumlah kardiomyosit. Kapasitas ini tidak mencukupi untuk mengganti kardiomyosit yang mengalami cedera atau kerusakan.¹⁴

Kardiomioplasti seluler atau juga disebut *cell-based cardiac repair* merupakan salah satu teknik dalam terapi regeneratif yang potensial di mana sel progenitor yang dapat berasal dari *stem cell* digunakan untuk memperbaiki area miokard yang nekrosis atau mengalami kerusakan. Kardiomioplasti seluler bertujuan mengganti jaringan miokard yang rusak akibat proses degeneratif, menginduksi peningkatan vaskularisasi pada daerah yang mengalami kerusakan, mencegah *remodelling* patologis setelah terjadinya atrofi serta untuk mengembalikan fungsi miokard pada otot jantung yang mengalami infark miokard.^{7,8} Proses kardiomioplasti seluler diawali dengan penyediaan sumber *stem cell* yang dikembangkan di dalam laboratorium secara *in vitro* yang kemudian dapat diaplikasikan secara *in vivo*.¹⁵⁻¹⁸

Secara teknis, kardiomioplasti seluler dilakukan dengan cara penanaman (*grafting*) sel miogenik pada miokardium untuk mencegah terjadinya penurunan fungsi kontraktilitas dan kerusakan miokardium. Diharapkan sel yang telah ditanam tersebut akan menyerupai miosit yang telah rusak, baik secara morfologi maupun secara fungsi yaitu kemampuan berkontraksi dan mengadakan hubungan elektrik dengan kardiomyosit yang masih tersisa.¹⁹

Dalam proses penanaman sel, hal terpenting yang menjadi tujuan adalah penanaman sel dapat dilakukan dengan jumlah sel yang cukup dan dapat mencapai retensi sel dengan jumlah yang maksimal pada daerah yang dituju. Untuk mencapai hal tersebut, terdapat tiga teknik

yang sering digunakan dalam kardiomioplasti seluler yaitu infusi intrakoroner, injeksi perkutan endokardial dan injeksi secara langsung pada miokardium ketika operasi berlangsung. Infusi intrakoroner membutuhkan proses migrasi sel dari pembuluh darah koroner ke daerah yang rusak. Tidak semua jenis sel dapat ditanam menggunakan teknik infusi intrakoroner. Sel-sel progenitor yang berasal dari sumsum tulang atau sel progenitor hematopoietic diketahui dapat melakukan ekstrasvasi dan migrasi ke daerah iskemik sehingga cocok digunakan pada teknik infusi intrakoroner. Sedangkan sel mesenkimal tidak dapat melakukan proses tersebut dan justru dapat menimbulkan sumbatan pada arteri yang dapat memperparah kondisi iskemik pada miokardium. Teknik penanaman sel progenitor secara langsung baik menggunakan kateter atau injeksi saat pembedahan relatif mampu memunculkan jumlah retensi sel yang cukup tinggi dengan risiko penyumbatan yang kecil.¹⁹

Beberapa jenis populasi *stem cell* dapat digunakan untuk kardiomioplasti seluler. Mekanisme *stem cell* dalam memperbaiki struktur dan fungsi miokardium belum dapat dijelaskan secara menyeluruh. Namun, terdapat dua mekanisme perbaikan dasar yaitu pemicu neovaskularisasi secara langsung maupun tidak langsung serta diferensiasi *stem cell* atau sel progenitor yang ditanam menjadi kardiomiosit dan jaringan miokardium. Selain itu, kardiomioplasti seluler juga dapat meningkatkan fungsi parakrin dari beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin yang secara tidak langsung dapat menghambat apoptosis sel dan memicu mobilisasi sel progenitor internal pada jantung. *Stem cell* yang baru ditransplantasikan juga diketahui dapat melakukan fusi dengan kardiomiosit yang telah mati atau berdiferensiasi langsung menjadi kardiomiosit untung memperbaiki fungsi miokardium.¹⁹

PEMROGRAMAN ULANG *STEM CELL* SEBAGAI SUMBER SEL UNTUK KARDIOMIOPLASTI SELULER

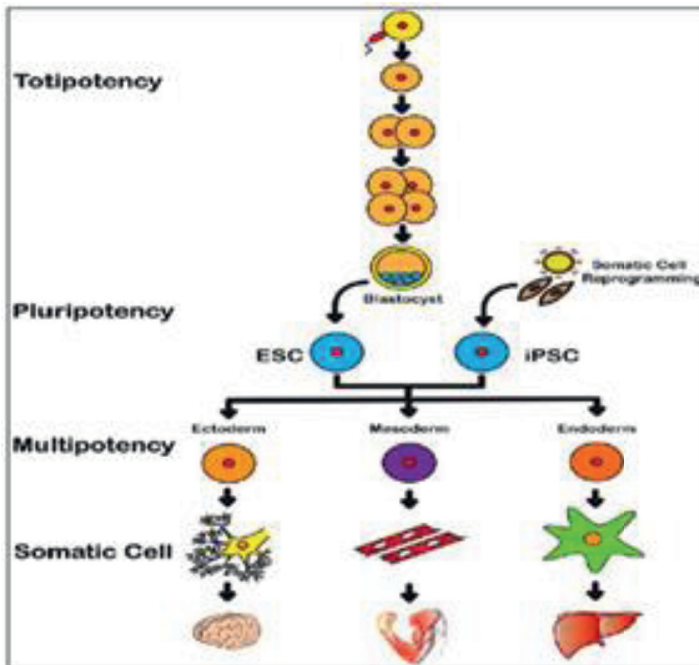
Secara terminologi, *stem cell* berasal dari kata *stem* yang berarti batang dan *cell* yang berarti sel sehingga *stem cell* dapat diartikan sebagai awal dari berbagai sel penyusun di tubuh manusia. Komisi Bioetika Nasional dan Pusat Bahasa telah menetapkan *stem cell* sebagai standar penyebutan istilah *stem cell* untuk digunakan dalam bahasa Indonesia.

Suatu sel dapat disebut sebagai *stem cells* jika memenuhi sifat dan kemampuan dasar untuk memperbarui diri sendiri (*self-renewal*), tidak mempunyai fungsi khusus pada tingkat awal perkembangannya dan mampu menjadi berbagai macam sel di dalam tubuh melalui aktivasi sinyal intraseluler, faktor transkripsi, faktor pertumbuhan, sitokin, kemokin, hormon, dan berbagai macam faktor lingkungan, seperti stres dan tekanan oksigen.²⁰

Stem cell mulai berkembang di seluruh dunia sejak tahun 1950-an, yaitu sejak ditemukannya sel yang berada di sumsum tulang dan dapat membentuk semua jenis sel darah manusia yang selanjutnya disebut *stem cell* hematopoietik. *Stem cell* itulah yang berperan sebagai permulaan awal pertumbuhan sel dalam menyusun tubuh manusia secara keseluruhan. Terapi *stem cell* menjadi harapan baru sebagai terapi mutakhir untuk berbagai macam penyakit degeneratif yang menjadi penyebab kematian sekaligus menurunkan kualitas hidup manusia seperti infark miokard akut, aterosklerosis, stroke, dan diabetes melitus.¹⁰ Terdapat dua karakteristik yang membedakan *stem cell* dengan jenis sel yang lain sehingga dapat digunakan sebagai terapi regeneratif, yaitu *stem cell* dapat memperbaiki diri dan dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel lainnya.^{21,22} Beberapa kriteria yang harus dimiliki *stem cell* untuk aplikasi terapi regeneratif, yaitu 1) sel dapat didapatkan dalam jumlah yang besar dan dengan prosedur invasif sederhana, 2) sel dapat berdiferensiasi menjadi sel matur dengan

beberapa intervensi, 3) sel relatif aman ketika ditransplantasikan, dan 4) sel dapat diproduksi sesuai dengan pedoman *good manufacturing practice*.²³

Stem cells secara garis besar dapat diklasifikasikan berdasarkan potensi diferensiasinya dan sumber selnya. Berdasarkan potensi dan kemampuannya untuk berdiferensiasi, *stem cells* dibagi menjadi tiga grup besar, yaitu *stem cells* totipoten, pluripoten, dan multipoten. *Stem cells* totipoten berasal dari fertilisasi sel telur dan sel sperma yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel di dalam tubuh. *Stem cells* pluripoten adalah *stem cells* yang dapat berdiferensiasi menjadi sel tubuh berdasarkan tiga lapisan embrional yaitu ektoderm, mesoderm, dan endoderm. Sedangkan *stem cells* multipoten adalah *stem cells* yang



Gambar 1. Klasifikasi *stem cells* berdasarkan potensi diferensiasinya.²⁶

hanya mampu berdiferensiasi menjadi jenis sel yang berada dalam sekelompok golongan sel yang serupa misalnya sel-sel pada sistem hematopoietik ataupun sistem saraf.²⁴ Selain berdasarkan potensi diferensiasinya, *stem cells* juga dapat diklasifikasikan berdasarkan sumbernya yaitu *human embryonic stem cell* (hESC), *stem cells* dewasa (*non-embryonic/ somatic/adult stem cells*), dan *induced pluripotent stem cells* (iPSC).^{25,26}

Stem cell embrionik merupakan awal dari seluruh jenis sel dalam tubuh. Sel ini dapat dijumpai saat perkembangan individu pada tahapan blastokista saat perkembangan embrio. *Stem cell* embrionik tergolong bersifat pluripoten dan memiliki daya proliferasi yang tinggi. *Stem cell* embrionik dikenali melalui ekspresi beberapa faktor transkripsi untuk seperti Octamer-4, POU5F1 (OCT4), NANOG, SOX2, SSEA-4, TRA-1-60, dan TRA-1-81.²⁷ Meskipun *stem cell* embrionik mempunyai kemampuan diferensiasi dan proliferasi yang tinggi, namun terdapat beberapa kendala pada aplikasinya yaitu masalah kode etik karena biasanya diambil dari embrio yang tidak terpakai setelah proses fertilisasi *in vitro*, adanya kemungkinan rejeksi imun, dan kemungkinan berproliferasi menjadi tumor seperti teratoma.²⁸

Sumber *stem cell* lainnya adalah *stem cell* dewasa atau *adult stem cells*. *Stem cell* dewasa adalah *stem cell* yang didapatkan dari jaringan yang telah dewasa dan mempunyai kemampuan untuk memperbarui diri dan berdiferensiasi menjadi sel yang sesuai dengan jaringan asalnya serta juga dapat menjadi beberapa jenis sel lainnya. Misalnya *stem cell* yang berasal dari sumsum tulang dan jaringan dewasa lainnya seperti pada saraf, adiposa, otot skeletal, pankreas, darah perifer²⁹, *blood cord*,³⁰ dan urine.³¹

Sumber *stem cell* yang dapat diproduksi di laboratorium secara *in vitro* disebut sebagai *induced pluripotent stem cells* (iPSC) atau biasa disebut dengan *stem cell* hasil induksi. *Induced pluripotent stem cells* adalah sel induk dengan sifat pluripoten yang dapat diproduksi dari

sel yang telah terdiferensiasi atau sel somatik dewasa melalui proses pemrograman ulang sel.^{32,33} Sumber sel yang dapat dijadikan iPSC di antaranya adalah fibroblas,³⁴ keratinosit,³⁵ *mesenchymal stem cells* (MSC),³⁶ mukosa oral,³⁷ sel-sel pulpa gigi,³⁸ darah perifer,²⁹ *blood cord*,³⁰ dan urine.³¹

Induced pluripotent stem cells dapat diatur untuk memiliki sub tipe sel yang unik dan variasi ekspresi gen yang lebih banyak untuk memudahkan proses diferensiasi berikutnya.³⁹ Produksi iPSC memiliki beberapa keuntungan yaitu induksi iPSC membutuhkan waktu yang relatif singkat dari proses isolasi hingga aplikasi iPSC. Sumber sel yang akan digunakan untuk iPSC juga dapat diambil dengan prosedur invasif sederhana dan dapat diambil dari sel somatik dewasa pada pasien yang sudah lanjut usia.⁴⁰ Sel iPSC juga memiliki risiko rejeksi yang rendah karena biasanya sumber sel iPSC akan diambil dan kemudian diaplikasikan pada orang yang sama (autolog). *Induced pluripotent stem cells* juga merupakan alternatif yang potensial untuk terapi regeneratif berbagai macam penyakit degeneratif.^{39,41}

STEM CELL DEWASA

Stem cell dewasa adalah *stem cell* yang dapat ditemukan di dalam jaringan dewasa, di antara sel-sel yang telah berdiferensiasi. *Stem cell* dewasa merupakan sel yang belum berdiferensiasi dan masih bersifat inaktif di jaringan dewasa. Berbeda dengan *stem cell* embrionik, *stem cell* dewasa memiliki kapasitas diferensiasi yang lebih rendah, yaitu hanya mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dalam satu golongan. Berdasarkan bukti ilmiah, kemampuan diferensiasi *stem cell* dewasa tergolong multipoten. Isolasi *stem cell* dewasa juga lebih menantang dibandingkan dengan *stem cell* embrionik. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi *stem cell* dewasa sangat rendah jika dibandingkan dengan sel-sel dewasa. Meskipun demikian, *stem cell* dewasa masih sering

digunakan pada berbagai penelitian dan aplikasi klinis karena memiliki beberapa keunggulan.^{13,14,42}

Kelebihan yang dimiliki *stem cell* dewasa adalah sumber *stem cell* dapat diperoleh pasien sendiri sehingga risiko penolakan imun menjadi lebih rendah jika diaplikasikan langsung pada pasien tersebut. Selain itu, *stem cell* dewasa bukan merupakan sel primitif sehingga intervensi pada sel untuk proses pemrograman ulang menjadi lebih mudah dan sederhana. Namun, penggunaan *stem cell* dewasa juga terdapat beberapa kekurangan yaitu 1) sulit didapatkan dalam jumlah yang banyak karena persentasenya yang sedikit pada jaringan matur, 2) masa hidupnya yang singkat, dan 3) kemampuan diferensiasi yang tidak seluas *stem cell* embrionik, namun dapat menguntungkan karena memiliki risiko yang rendah untuk berdiferensiasi menjadi keganasan bila dibandingkan dengan *stem cell* embrionik.⁴³

Sebagian besar jaringan dan organ tubuh yang telah matur mengandung *stem cell* dewasa. Keberadaan *stem cell* dewasa dapat menjaga homeostasis jaringan tempatnya berada. *Stem cell* dewasa dapat diklasifikasikan berdasarkan organ tempatnya berada atau golongan sel yang akan menjadi alur diferensiasinya, seperti *stem cell* hematopoietik, *stem cell* jantung, *stem cell* mesenkimal, *stem cell* saraf, *stem cell* jaringan kulit, dan sebagainya. Dalam beberapa tahun terakhir, bukti ilmiah menunjukkan adanya keistimewaan dari *stem cell* dewasa yaitu *stem cell* dewasa dapat mengalami diferensiasi di luar golongan sel tersebut yang disebut dengan transdiferensiasi. Sebagai contoh *stem cell* hematopoietik ternyata mampu berdiferensiasi menjadi kardiomyosit, sel mesenkimal mampu berdiferensiasi menjadi sel-sel saraf dan *stem cell* jantung mampu berdiferensiasi menjadi sel beta pankreas.^{10,44,45}

STEM CELL HEMATOPOIETIK DARI DARAH TEPI

Stem cell hematopoietik merupakan sel yang dapat berdiferensiasi menjadi seluruh progenitor sel darah yang berperan pada hamatopoeisis dan fungsi imun tubuh. *Stem cell* hematopoietik juga diketahui dapat membentuk sel-sel somatik lainnya seperti kardiomyosit, sel otot lurik, sel saraf, epitel paru, dan sebagainya. *Stem cell* hematopoeitik dapat diisolasi dari sumsum tulang dan darah tepi.^{10,29,46}

Sel-sel darah dapat terus melakukan regenerasi dengan mudah dan cepat karena terus diproduksi dalam jumlah besar oleh sumsum tulang. Pengambilan darah tepi merupakan prosedur minimal invasif yang telah banyak digunakan dan tidak menimbulkan kekhawatiran karena sel-sel yang diambil akan diganti secara alami oleh produksi sel induk dari sumsum tulang tubuh. Jika tidak dapat dilakukan pengambilan secara langsung, sampel darah secara mudah dapat tersedia di bank darah yang menyimpan dalam jumlah banyak dari beragam usia, jenis kelamin, dan beberapa kriteria lainnya. Proses penggantian dan regenerasi yang cepat membuat sel-sel darah tepi secara terus-menerus diremajakan oleh sel induk dari sumsum tulang sehingga sel-sel tersebut akan tidak banyak memiliki mutasi terkait lingkungan.^{29,47}

Penggunaan darah tepi sebagai sumber pengambilan *stem cell* hematopoietik memiliki dua metode yang secara umum digunakan untuk memanen sumber sel. Metode pertama adalah menggunakan prinsip mobilisasi dan apheresis. Donor akan diberikan injeksi suatu agen mobilisator yaitu *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) untuk memicu mobilisasi sel hematopoeitik dari sumsum tulang ke darah tepi. Proses berikutnya adalah aferesis untuk memisahkan *stem cell* dari darah tepi. Namun, kelemahan dari metode ini adalah prosesnya yang panjang, biaya yang mahal, dan menimbulkan efek samping pada donor. Agen G-CSF diketahui dapat menimbulkan efek samping

seperti nyeri pada tulang, nyeri kepala dan mual-muntah.⁴⁶ Alternatif metode lain yang mulai banyak digunakan saat ini adalah isolasi sel mononuklear spesifik dari darah tepi melalui pengambilan sampel darah tepi yang minimal invasif (flebotomi). Isolasi ini menggunakan prinsip perbedaan densitas menggunakan metode sentrifugasi dan suatu bahan yang dinamakan *Ficoll-hypaque*.^{46,48}

Salah satu penanda permukaan yang sering digunakan sebagai karakteristik *stem cell* hematopoietik adalah CD34+ sehingga juga dikenal sebagai sel CD34+. Penanda CD34+ merupakan suatu fosfolipoprotein transmembran yang pertama kali diidentifikasi pada *stem cell* hematopoietik. Molekul dengan berat sekitar 115 kDa ini sebagian besar berfungsi dalam proses sitoadhesi, regulasi diferensiasi, dan proliferasi sel. Molekul CD34 dapat memfasilitasi adhesi sel pada endotel vaskular, meningkatkan proliferasi sel dan menghambat diferensiasi sel. Selain itu, CD34 juga berfungsi untuk migrasi (*homing*) sel *stem cell* hematopoietik pada sumsum tulang atau jaringan lainnya. Pada praktik klinis, penanda CD34 bermanfaat untuk memastikan transplantasi *stem cell* dapat secara tepat menuju sumsum tulang dan juga dapat digunakan sebagai penanda selektif proses isolasi *stem cell* hematopoietik imatur. Meskipun CD34 dapat digunakan sebagai penanda *stem cell* hematopoietik, namun beberapa kriteria dari penanda lain juga digunakan untuk meningkatkan spesifitas proses isolasi *stem cell* hematopoietik seperti persentase ekspresi CD90, CD38, *human leukocyte antigen-DR* dan penanda sel hematopoietik matur (*lin*).⁴⁹

Stem cell hematopoietik dapat berdiferensiasi menjadi semua sel darah. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sel CD34+ berpotensi sebagai terapi regeneratif untuk penyakit kardiovaskular. Ide ini didasarkan pada hasil penelitian yang menunjukkan bahwa sel CD34+ juga mampu berdiferensiasi menjadi sel spesifik salah satunya adalah kardiomyosit.^{46,49} Selain itu, diketahui bahwa sel CD34+ berasal dari

lapisan embrionik yang sama dengan organ jantung saat organogenesis yaitu lapisan mesoderm sehingga memiliki potensi yang besar untuk berdiferensiasi menjadi kardiomyosit.⁵⁰ Pengambilan melalui darah perifer merupakan prosedur minimal invasif untuk mendapatkan sel CD34+. Sel darah perifer secara terus-menerus diremajakan oleh sel induk dari sumsum tulang sehingga sel tersebut memiliki lebih sedikit titik mutasi terkait lingkungan. Oleh karena itu, darah dapat menjadi alternatif sumber *stem cell* yang baik.^{29,47} Pengambilan darah perifer hanya membutuhkan sekitar 10 mL darah untuk proses isolasi sel CD34+ hingga proses *reprogramming*. Bahkan penelitian oleh Tan *et al.* (2014) menunjukkan hanya dengan volume darah yang didapatkan dari proses *finger-prick* dapat menghasilkan isolasi CD34+ yang baik dan memiliki efisiensi pemrograman ulang yang tinggi yaitu sebesar 100–600 koloni per mL.^{46,48}

Kemampuan diferensiasi dan regenerasi dari *stem cell* hematopoietik dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti faktor transkripsi, faktor pertumbuhan dan lingkungan mikro sel. Selain faktor tersebut, terdapat suatu mekanisme epigenetik yang penting dalam regulasi diferensiasi *stem cell* hematopoietik. Ketika *stem cell* mengalami maturasi, sel tersebut mengalami perubahan ekspresi gen yang dapat menjadi jenis sel tertentu. Perubahan-perubahan ini dapat dikontrol pada level transkripsi dengan mekanisme epigenetik meliputi metilasi-demetilasi DNA, modifikasi histon, dan *microRNA induced silencing gene*.^{46,47} Proses-proses tersebut dapat dijadikan dasar intervensi atau perlakuan dalam upaya pemrograman *stem cell* hematopoietik menjadi sel lain.

3

Isolasi dan Kultur Sel

METODE ISOLASI SEL

Pada dunia penelitian, pemisahan atau isolasi sel dari populasinya memungkinkan studi lebih lanjut pada individu sel tersebut tanpa kontaminasi dari tipe sel lainnya. Teknologi isolasi sel telah bermanfaat pada berbagai penemuan di bidang biologi sel seperti terapi regeneratif dan terapi kanker. Pada aplikasi klinis, isolasi sel sangat bermanfaat untuk tujuan terapi sel pada pasien yang membutuhkan salah satu contohnya ada kardiomioplasti seluler pada pasien dengan infark miokard. Penggunaan metode isolasi yang memiliki selektivitas yang tinggi dapat meningkatkan kualitas terapi dan meningkatkan *outcome* klinis dari terapi menggunakan sel. Hal tersebut yang mendasari para peneliti untuk terus mengembangkan berbagai teknik dan

metode isolasi sel terbaru untuk terapi regeneratif maupun *tissue engineering*.^{51,52}

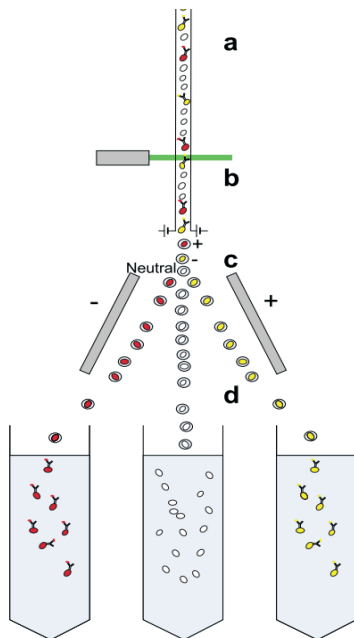
Berbagai macam metode dan teknik isolasi yang berkembang hingga saat ini sejatinya didasarkan pada tiga teknik pemisahan dasar yaitu pemisahan berdasarkan adhesensi, densitas, dan ikatan antibodi. Ketiganya juga sering kali digunakan secara kombinasi untuk meningkatkan kualitas hasil isolasi sel. Pemilihan metode isolasi sel ini sangat bergantung dari berbagai keadaan peneliti karena masing-masing metode memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing.⁵¹

Metode pertama yang memiliki proses yang relatif sederhana adalah metode adhesensi. Metode adhesensi biasanya digunakan untuk separasi sel dari jaringan yang dihancurkan. Semisal isolasi sel dari jaringan pulpa gigi yang dihancurkan kemudian disaring dan ditanam secara langsung pada cawan kultur plastik. Beberapa hari kemudian sel stromal akan mengalami adheren dan sel lainnya akan mati. Teknik ini sangat murah dan sederhana namun spesifisitasnya sangat diragukan. Bagaimanapun juga teknik ini masih dapat dipakai pada isolasi sel sederhana yang tidak membutuhkan kemurnian hasil isolasi yang tinggi atau tidak membutuhkan isolasi sel pada subpopulasi tertentu.^{51,52}

Isolasi sel menggunakan densitas menggunakan mesin sentrifugasi telah sering digunakan pada setting laboratorium dan klinis. Metode densitas ini sering dilakukan pada sampel darah karena kemampuannya yang baik dalam separasi sel dalam jumlah banyak dengan bantuan medium separasi. Sebagai contoh adalah pemisahan sel mononuklear dari darah tepi untuk terapi berbagai kondisi penyakit salah satunya adalah leukemia. Meskipun begitu, metode densitas ini tidak dapat secara spesifik memisahkan jenis sel yang berbeda namun dengan densitas yang sama. Hal ini bisa diatasi dengan penggunaan medium sentrifugasi yang berbeda atau

kecepatan sentrifugasi yang bervariasi. Namun, spesifitas hasil isolasi dengan metode ini juga terbatas sehingga metode ini digunakan pada isolasi yang tidak terlalu membutuhkan kemurnian yang tinggi atau digunakan sebagai proses *pre-enrichment* untuk menghilangkan sel-sel yang tidak dibutuhkan pada sampel seperti sel darah merah atau platelet pada sampel darah.⁵¹

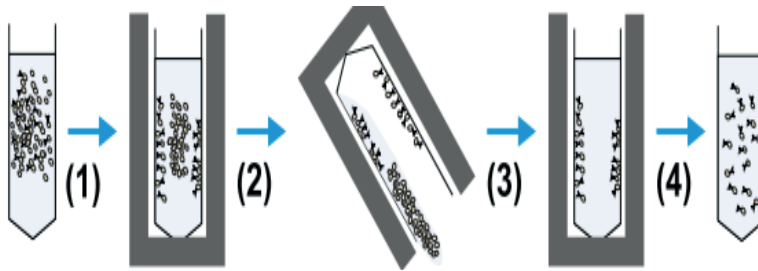
Metode ikatan antibodi merujuk pada dua teknik isolasi sel yang paling sering digunakan saat ini yaitu *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) dan *magnetic-activated cell sorting* (MACS).^{53,54} Keduanya menggunakan prinsip pengenalan dan ikatan antibodi dengan antigen permukaan sel yang akan diisolasi. Metode FACS menggunakan antibodi yang berpendar (fluorosens) untuk mengenali sel sedangkan MACS menggunakan *iron oxide* yang mengandung *microbeads* yang



- a. Sel yang telah terlabel fluoresen disaring untuk menghilangkan agregat sel lain
- b. Sel akan melewati laser yang akan mendeteksi label fluoresen tersebut sehingga akan terdeteksi apakah sel memenuhi label sel panjang gelombang/*threshold* tertentu
- c. Kemudian sel dengan *threshold* tertentu akan diteruskan dan dipisahkan kembali berdasarkan gradien listrik tertentu
- d. Sel hasil isolasi ditempatkan pada tabung yang berbeda sesuai dengan isolasi sel yang diinginkan

Gambar 2. Prinsip metode FACS

bersifat magnetik. Metode FACS lebih sering digunakan karena spesifisitasnya yang lebih tinggi karena sel yang akan diisolasi dapat diikat oleh beberapa antibodi dalam satu waktu. Kemampuan tersebut tidak didapat dilakukan menggunakan metode MACS yang hanya dapat menggunakan satu antibodi penanda saja. Namun, metode MACS lebih superior dibandingkan FACS dalam efisiensi waktu, di mana FACS membutuhkan waktu beberapa jam untuk isolasi, sedangkan MACS hanya memerlukan waktu kurang dari satu jam.⁵¹ Prinsip metode FACS dan MACS dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.



(1) Suspensi sampel sel dengan label magnetik ditaruh dalam tabung (2) kemudian diletakkan pada magnet yang menyebabkan sel yang terlabel dengan bahan magnetik akan bergerak ke sisi tabung (3) medium suspensi dibuang sehingga sel yang tidak menempel di sisi tabung akan terbuang (4) sel hasil isolasi diresuspensi untuk penggunaan lebih lanjut.

Gambar 3. Prinsip metode MACS.⁵¹

MEDIA TANAM PADA KULTUR SEL

Kondisi *stem cell* ditentukan oleh lingkungan mikro sel (*niche*). Lingkungan mikro sel terdiri dari komponen seluler dan aseluler yang saling berhubungan melalui beberapa jalur sinyal yang kompleks. Komponen utama dari lingkungan mikro sel terdiri dari matriks ekstraseluler, saraf, pembuluh darah, sel pendukung, *shear stress*,

tekanan oksigen, dan faktor pertumbuhan. Lingkungan mikro berperan besar terhadap adhesi *stem cell* dan regulasi proliferasi dan diferensiasi. Lingkungan mikro juga berhubungan dengan efek proteksi *stem cell* supaya tidak berkembang menjadi sel karsinogenik dan proteksi dari kerusakan akibat stimulus ekstraseluler, mempertahankan produksi, dan jumlah *stem cell*.⁵⁵

Proses adhesi sel didefinisikan sebagai interaksi antar sel satu dengan sel lainnya dan juga interaksi antara sel terhadap matriks ekstraseluler. Proses adhesi ini ditentukan oleh matriks ekstraseluler yang tersedia dan dibantu oleh beberapa reseptor, hormon, dan faktor pertumbuhan. Matriks ekstraseluler sangat penting untuk proses adhesi sel, menunjang fungsi sel dan stabilisasi jaringan melalui aktivasi beberapa jalur pensinyalan yang diaktivasi oleh ikatan matriks ekstraseluler dengan reseptor permukaan sel yang disebut dengan *integrin*. Ikatan antara matriks ekstraseluler dengan *integrin* ini akan mengaktifasi proses-proses berikutnya yang berhubungan dengan proliferasi dan *spreading* sel. Tidak adanya proses adhesi sel ini membuat sel tidak dapat menjalani fungsi-fungsinya untuk hidup dan kemudian akan mengalami kematian.^{55,56}

Komponen utama dari matriks ekstraseluler terdiri dari kolagen, glikoprotein (laminin, vitronektin, dan fibronektin), dan proteoglikan. Fibronektin dan vitronektin merupakan dua komponen yang cukup banyak didapatkan pada matriks ekstraseluler. Fibronektin merupakan glikoprotein ekstraseluler utama pada sel yang terdistribusi di seluruh tubuh dan memiliki peran vital pada organisasi protein matriks ekstraseluler. Fibronektin memiliki *domain* tipe I, II dan III. Sebagian besar adhesi sel dengan fibronektin terletak pada interaksi antara *domain* I dan III dengan *integrin* $\alpha 5\beta 1$ dan αV -class. Vitronektin merupakan glikoprotein dengan molekul yang lebih kecil dibanding dengan fibronektin. Selain pada matriks ekstraseluler, vitronektin juga ditemukan pada plasma darah. Vitronektin menjalankan fungsi

adhesi, *spreading*, dan migrasi sel melalui interaksinya dengan *integrin* $\alpha\beta5$ and $\alpha\beta1$.⁵⁵

Pada aplikasi kultur *stem cell in vitro*, jenis matriks ekstraseluler yang digunakan menentukan tingkat adhesi, pertumbuhan, dan perkembangan *stem cell* hematopoietik. Fungsi komponen matriks ekstraseluler pada kondisi *in vivo* dapat dijadikan dasar penentuan matriks ekstraseluler yang dapat digunakan pada kultur *in vitro*. Pada *stem cell* hematopoietik, masing-masing komponen matriks ekstraseluler terlibat dalam proliferasi, diferensiasi dan apoptosis *stem cell* hematopoietik. Sebagai contoh, adhesi sel pada fibronektin dan kolagen tipe I berfungsi untuk proliferasi dan hematopoiesis jangka panjang *stem cell* hematopoietik dengan penanda CD34+. Laminin berperan pada proses *homing* dan siklus sel pada *stem cell* hematopoietik.⁵⁷

4

Metode Isolasi dan Kultur CD34 Darah Tepi

INSTRUMEN DAN BAHAN YANG DIGUNAKAN UNTUK ISOLASI & KULTUR SEL CD34 DARAH TEPI

Biohazard safety cabinet; inkubator dengan kelembapan dan gas yang dikontrol untuk mempertahankan suhu 37°C dan kelembapan 95% pada atmosfer udara yang mengandung CO₂ 5%; sentrifus; mikro pipet; tabung sentrifus; culture plate; culture well; mikroskop; freezer -20°C; refrigerator (2-8°C); Sampel darah vena sebanyak 40 mL dalam tabung EDTA; Ficoll-Hypaque suspension; Kit for Human Blood CD34⁺ Cells (Stem Cells Technologies no. katalog 05925) yang terdiri dari RosetteSepTM Human Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Cocktail, EasySepTM Human CD34 Positive Selection Cocktail dan EasySepTM Dextran RapidSpheresTM 50100; StemSpanTM SFEM II; EasySepTM Magnet; StemSpanTM CD34⁺ Expansion Supplement (10x); ReproTeSRTM yang terdiri dari TeSRTM-E7TM/

ReproTeSR™ Basal Medium dan ReproTeSR™ 25X Supplement; Tissue culture-treated cultureware; Falcon® Conical tubes; D-PBS (tanpa Ca²⁺ dan Mg²⁺); Dulbecco's Phosphate Buffered Saline dengan 2% Fetal Bovine Serum (PBS+ 2% FBS).

KOLEKSI SAMPEL DARAH TEPI

Sel CD34⁺ diperoleh dari sampel darah tepi seorang pria yang sehat berusia 27 tahun dan bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani *informed consent*. Setelah mendapat persetujuan, darah tepi diambil dari vena kubiti sebanyak 40 cc oleh staf laboratorium terlatih. Subjek sehat untuk mengikuti penelitian ini bila memenuhi kriteria sebagai berikut.

1. Tidak memiliki infeksi menular HIV, HBV, dan HCV
2. Tidak memiliki riwayat infark miokard akut, gagal jantung, aritmia ganas, penyakit katup jantung, stroke, *transient ischemic attack*, penyakit arteri perifer diabetes melitus, dan gagal ginjal.
3. Memiliki struktur dan fungsi jantung normal secara ekokardiografi.

PROSES PRE-ENRICHMENT SEL CD34⁺ DARAH TEPI

Proses *pre-enrichment* dilakukan untuk meningkatkan selektifitas hasil isolasi sel dari darah tepi. *Pre-enrichment* menggunakan metode pemisahan berdasarkan densitas menggunakan *Ficoll-hypaque*. Langkah-langkah metode ini adalah sebagai berikut.

1. Sampel darah tepi diambil sebanyak 40 cc dan ditambah dengan EDTA.
2. Sampel darah dituang ke dalam konikel 50cc. Kemudian sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

3. Hasil sentrifugasi akan membentuk dua lapisan. Bagian atas berupa plasma darah dan bagian bawah berupa sel darah.
4. Lapisan atas yang berupa plasma darah diaspirasi secara perlahan dan pindahkan ke dalam konikel 15 ml yang baru. Plasma darah tersebut disimpan dan akan digunakan untuk *coating plate* sebelum dilakukan kultur sel CD 34+.
5. Lapisan bagian bawah yang berupa sel darah ditambahkan larutan PBS dan dilakukan resuspensi hingga menjadi larutan yang homogen.
6. Larutan yang telah homogen ditambahkan ke dalam tabung konikel 15 ml yang telah berisi larutan *Ficoll*.
7. Kemudian campuran tersebut dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 30 menit.
8. Hasil sentrifugasi akan terbentuk 3 lapisan yaitu bagian atas yang berwarna jernih kekuningan berupa plasma darah, bagian tengah yang berbentuk cincin berkabut berupa *buffy coat* dan bagian bawah yang berwarna merah pekat berupa eritrosit.
9. Bagian tengah yang berbentuk cincin berupa *buffy coat* diambil dan ditambahkan dengan medium.

PROSES ISOLASI SEL CD34⁺ DENGAN METODE MAGNETIK

Prosedur isolasi magnetik sel CD34⁺ sesuai dengan protokol *Stem Cells Technologies* (2018) sebagai berikut.

1. Hasil *pre-enrichment* sel CD34⁺ darah tepi ditambahkan ke dalam 5 mL (12x75 mm) *polystyrene round-bottom*.
2. *EasySepTM human CD34⁺ selection cocktail* 50uL ditambahkan pada setiap 1 mL sampel dan dicampur serta inkubasi pada temperatur ruangan (15–25°C) selama 10 menit.
3. Untuk memastikan suspensinya homogen, digunakan *Vortex* selama 30 detik.

4. Selanjutnya ditambahkan *EasySepTM Dextran RapidSpheresTM* 50–100 50 uL tiap 1 mL sampel dan dicampur serta diinkubasi pada suhu ruangan (15–25°C) selama 3 menit.
5. Kemudian ditambahkan medium pada sampel sebanyak 2,5 mL. Sampel lalu dicampur dengan *pipetting up* dan *down* 2–3 kali.
6. *Falcon® conical tube* ditempatkan dalam *EasySepTM magnet* dan inkubasi pada temperatur ruangan (15–25°C) selama 3 menit.
7. Setelah 3 menit, magnet dan *tube* dibalik dalam satu gerakan balik, lalu supernatan dituangkan.
8. *Tube* diambil dari magnet dan *tube* ini berisi sel yang telah terisolasi.
9. Langkah nomor 5, 6, 7, dan 8 tersebut diulang sebanyak 3 kali.
10. Terakhir, supernatan dibuang. Hasil isolasi sel CD34+ diresuspensi menggunakan medium ekspansi.
11. Identifikasi sel CD34+ secara kualitatif menggunakan metode imunofluorosens dilakukan untuk memastikan bahwa hasil isolasi merupakan sel dengan ekspresi CD34+.

EKSPANSI DAN PENGAMATAN KULTUR SEL CD34+ DARAH TEPI

Sel CD34⁺ diekspansi sesuai dengan protokol *Stem Cells Technologies* (2018). Ekspansi bertujuan untuk memperbanyak jumlah sel CD34⁺ hasil isolasi.

1. Pada hari pertama, jumlah sel CD34⁺ hasil isolasi dihitung menggunakan *cell counter*.
2. Kemudian dipersiapkan sejumlah *well* yang telah dilapisi oleh media tanam vitronektin pada perlakuan 1 (P1), fibronektin pada perlakuan 2 (P2), dan plasma darah pada perlakuan 3 (P3).
3. Semua *well* pada P1, P2, dan P3 ditanam sejumlah 50.000 sel dan dikultur menggunakan 2 mL medium ekspansi sel CD34⁺

(*StemSpanTM CD34⁺ Expansion Supplement (10x)*) yang dicampur dengan *ReproTeSRTM*) pada masing-masing *well*.

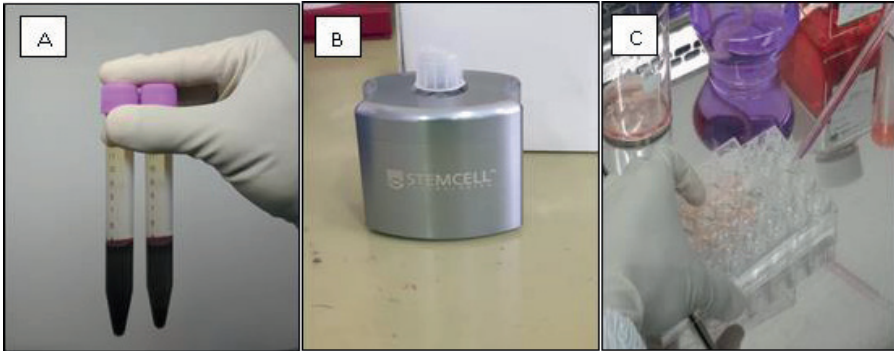
4. Kultur sel diinkubasi di dalam inkubator sel pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
5. Pengamatan berkala dan penggantian medium dilakukan pada hari ke-4 dan hari ke-7 kultur.
6. Pada hari ke-4, sel ditransfer pada *tube conical* 15 mL untuk penggantian medium. Dilanjutkan dengan sentrifus sel pada 300 x g selama 5 menit. *Supernatant* dibuang dan diresuspensi kembali dengan 2 mL medium ekspansi CD34⁺.
7. Pengamatan berkala dilakukan untuk evaluasi viabilitas, adherensi, dan konfluensi kultur sel. Hal ini dilakukan juga pada ekspansi kultur sel CD34⁺ hari ke-7.

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SEL CD34+ DARAH TEPI

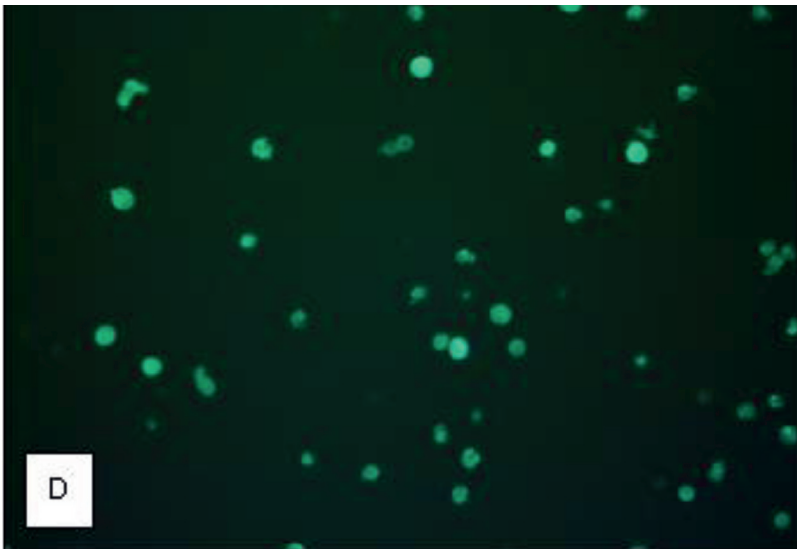
Sampel diambil dari darah tepi yang kemudian diproses untuk isolasi sel CD34⁺ menggunakan metode isolasi magnetik sesuai pedoman *kit* dengan beberapa modifikasi. Prosedur diawali dengan proses *pre-enrichment* yaitu isolasi *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) menggunakan metode sentrifugasi gradien *Ficoll*. Proses ini menghasilkan lapisan serupa cincin yang berkabut (*buffy coat*) yang kemudian diambil dan diresuspensi untuk proses selanjutnya (Gambar 4A). Sampel PBMC yang didapat kemudian diproses menggunakan metode *magnetic isolation* untuk mendapatkan sel CD34⁺ murni (Gambar 4B). Hasil isolasi sel CD34⁺ yang didapatkan kemudian ditanam pada *well* (Gambar 4C).

Identifikasi dilakukan untuk mengetahui bahwa sel hasil isolasi merupakan sel dengan penanda CD34 positif. Identifikasi sel hasil isolasi menggunakan metode imunofluorosens. Identifikasi sel hasil isolasi yang mengekspresikan CD34 ditunjukkan dengan adanya pendaran warna hijau yang diamati pada mikroskop fluorosens dengan perbesaran 400x. Metode isolasi ini berhasil mengisolasi sel dengan

penanda CD34 positif yang ditunjukkan dengan adanya pendaran warna hijau pada mayoritas sel yang tampak pada lapang pandang mikroskop. Hasil disajikan pada Gambar 5.



Gambar 4. (A) Hasil sentrifugasi menggunakan metode *gradien Ficoll* (B) Isolasi sel CD34+ darah perifer dengan *EasySep Magnet* (C) Proses *seeding* sel CD34+ pada *well*.



Gambar 5. Ekspresi CD34+ pada sel hasil isolasi (pendaran warna hijau) (Imunofluorosens, perbesaran 400x).

Metode isolasi sel yang dikerjakan dalam penelitian ini telah optimal menghasilkan sel CD34+ dari darah tepi. Penelitian ini mengombinasikan isolasi menggunakan metode densitas untuk *pre-enrichment* sampel kemudian diisolasi menggunakan metode MACS. Hal ini dilakukan untuk meningkatkan kemurnian hasil isolasi sel CD34+ pada penelitian ini. Isolasi sel menggunakan magnet telah menjadi standar biologi sel modern dan memiliki tingkat keberhasilan dan kualitas hasil isolasi yang baik. Teknik isolasi ini pertama kali digunakan untuk pemisahan sel darah merah dan sel yang dilapisi antibodi.⁵⁸

Isolasi sel CD34+ menggunakan metode magnetik juga telah berhasil dilakukan pertama kali oleh Kato *et al.* pada tahun 1993. Isolasi CD34+ menggunakan metode magnetik dapat menghasilkan persentase sel positif yang tidak berbeda signifikan dengan metode pemisahan menggunakan *flow cytometry*. Penelitian tersebut juga memaparkan bahwa sel CD34+ hasil isolasi metode magnetik tidak mengalami kerusakan dan masih dapat melakukan fungsi proliferasi dan diferensiasinya dengan baik ketika diberikan beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan.

Meskipun metode isolasi menggunakan *flow cytometry* masih menjadi pilihan terbaik karena efisiensi dan spesifitasnya yang tinggi, namun membutuhkan proses yang lebih panjang karena sel yang akan diisolasi dianalisis dan disortir secara serial. Selain itu, penggunaan *flow cytometry* seringkali dapat menurunkan tingkat viabilitas sel hasil isolasi. Isolasi dengan metode magnetik dapat menjadi alternatif yang baik karena dapat mengisolasi sel lebih cepat dan memiliki efisiensi dan spesifitas yang cukup baik.¹¹ Penelitian oleh Tripathi *et al.*, juga membandingkan isolasi sel CD34+ dengan metode magnetik dan metode pemisahan menggunakan *flow cytometry* untuk tujuan transplatasi sel CD34+ secara *in vivo* pada mencit model infark miokard. Tripathi *et al.*, menunjukkan bahwa kedua metode tersebut

dapat menghasilkan persentase spesifitas isolasi sel CD34+ yang tidak berbeda signifikan yaitu 87% pada metode magnetik dan 92% pada metode pemisahan *flow cytometry*. Hasil transplantasi sel CD34+ menggunakan kedua metode tersebut terbukti dapat meningkatkan angiogenesis, menurunkan pembentukan *scar* dan fibrosis serta memperbaiki fungsi jantung pasca infark miokard.⁵⁹

Saat ini, teknik pemisahan sel secara magnetik telah banyak digunakan dalam penelitian karena selektivitas dan spesifitasnya yang cukup tinggi, tetapi masih terus dikembangkan untuk menyesuaikan perkembangan teknologi yang dinamis.⁶⁰ Penelitian ini menggunakan kit yang khusus didesain untuk mengisolasi sel CD34+ dari darah tepi. Sel target akan ditandai dengan kompleks antibodi yang dapat mengenali CD34+ dan partikel magnet yang dilapisi dekstran. Sel yang telah dilabeli akan dipisahkan dengan menggunakan mesin magnet. Sel CD34+ akan tertinggal di dalam tabung sementara sel lain akan terbuang saat proses pencucian. Hasil isolasi sel CD34+ darah perifer menggunakan *kit* ini diklaim memiliki spesifitas hingga 99%.

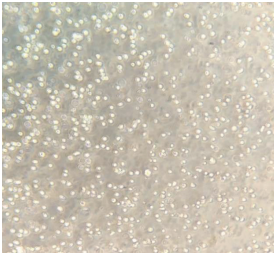
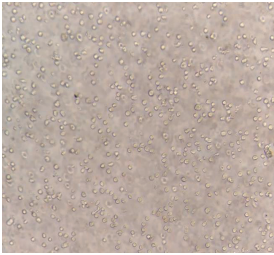
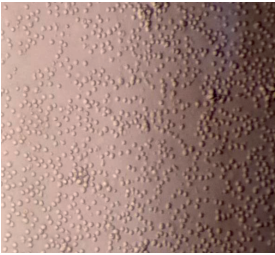
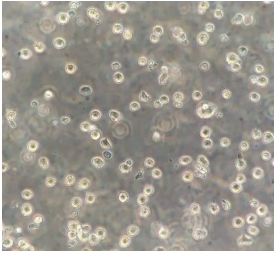
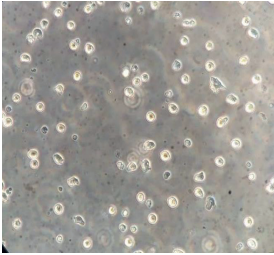
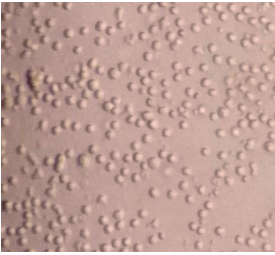
HASIL PENGAMATAN KULTUR SEL CD34+ DARAH TEPI

Pengamatan hari ke-0 menunjukkan kultur sel CD34+ yang sehat yang ditunjukkan dengan bentuk sel yang bulat namun belum terdapat sel yang adheren. Pengamatan hari ke-4 menunjukkan bahwa sel masih sehat dan terdapat perubahan morfologi sel CD34+ dengan media tanam plasma darah. Beberapa sel pada media tanam plasma darah telah adheren yang ditunjukkan dengan adanya sel dengan morfologi *spindle* atau oval. Sedangkan sel CD34+ pada media tanam vitronektin dan fibronektin tidak menunjukkan adanya adherensi dan banyak yang mengalami kematian sel yang ditunjukkan dengan bentuk permukaan sel yang keriput. Pada pengamatan hari ke-7, semakin banyak sel CD34+ yang adheren pada kultur sel dengan media

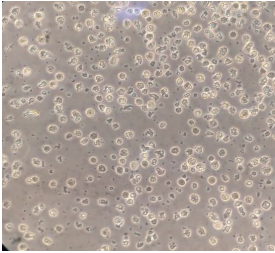
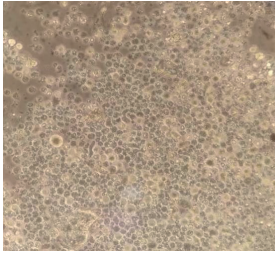

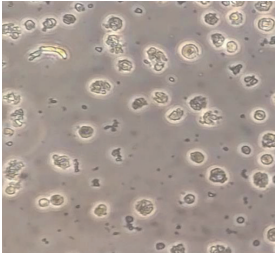
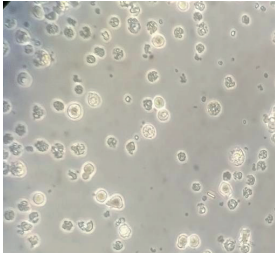
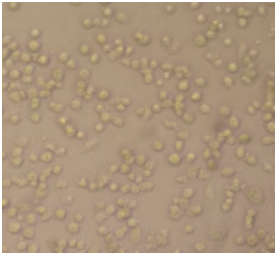
tanam plasma darah dan telah konfluen sebesar 75%. Beberapa sel CD34+ pada media tanam vitronektin dan fibronektin teramati telah adheren, namun jumlah sel yang mengalami kematian juga bertambah jumlahnya. Gambar perbandingan hasil pengamatan kultur sel CD34+ pada berbagai media tanam disajikan pada Tabel 1, Tabel 2, dan Tabel 3.

Pengamatan adhesi sel CD34+ pada kultur *in vitro* dapat diamati dengan adanya perubahan morfologi sel menjadi lebih oval hingga membentuk *spindle*.⁶¹ Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan matriks fibronektin dan vitronektin pada kultur sel CD34+ tidak menunjukkan adanya adhesi sel yang diamati secara visual. Penelitian oleh Yokota *et al.* dan Ahrens *et al.* menunjukkan adanya adhesi sel CD34+ yang diisolasi dari darah *umbilical cord* pada matriks fibronektin dengan viabilitas sel yang baik.^{61,62} Adhesi sel CD34+ dari darah

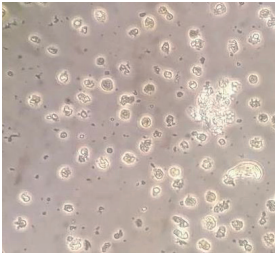
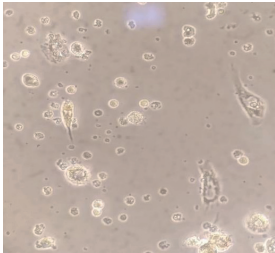
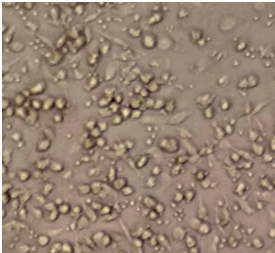
Tabel 1. Pengamatan Kultur Sel CD34+ Darah Tepi Hari ke-0

Vitronektin	Fibronektin	Plasma Darah
Perbesaran 200x	Perbesaran 200x	Perbesaran 200x
		
Perbesaran 400x	Perbesaran 400x	Perbesaran 400x
		

Tabel 2. Pengamatan Kultur Sel CD34+ Darah Tepi Hari ke-4

Vitronektin	Fibronektin	Plasma Darah
Perbesaran 200x	Perbesaran 200x	Perbesaran 200x
		
Perbesaran 400x	Perbesaran 400x	Perbesaran 400x
		

Tabel 3. Pengamatan Kultur Sel CD34+ Darah Tepi Hari ke-7

Vitronektin	Fibronektin	Plasma Darah
Perbesaran 400x	Perbesaran 400x	Perbesaran 400x
		

umbilical cord diketahui memiliki kemampuan adhesi yang baik pada fibronektin, sedangkan sel CD34+ dari darah tepi tidak. Hal ini diduga karena adanya perbedaan ekspresi *integrin*, yang merupakan salah satu

faktor penentu adhesi sel pada matriks ekstraseluler fibronektin. Sel CD34+ dari *umbilical cord* dominan memiliki ekspresi *integrin* famili $\alpha 4$, $\alpha 5$, dan $\beta 1$ serta memiliki ekspresi *integrin* famili $\beta 2$,^{61,63} sedangkan sel CD34+ darah tepi dominan mengekspresikan *integrin* famili $\beta 2$.⁶⁴ Selain itu, sel CD34+ dari *umbilical cord* merupakan sumber *stem cell* hematopoietik paling primitif jika dibandingkan dengan sel CD34+ yang didapatkan pada sumsum tulang maupun darah tepi. Semakin primitif suatu *stem cell* maka ekspresi *integrin* akan semakin tinggi, sebaliknya semakin sel terdiferensiasi maka ekspresi *integrin* akan semakin berkurang sehingga menurunkan kemampuan adhesi sel pada matriks ekstraseluler.⁶⁵

Penggunaan plasma darah sebagai matriks dan medium kultur sel sudah cukup sering digunakan dalam aplikasi kultur sel *in vitro*. Plasma darah secara alamiah diketahui mengandung berbagai komponen matriks ekstraseluler, seperti fibronektin, vitronektin, dan laminin yang mendukung adhesi sel. Selain itu, plasma darah juga mengandung berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan yang turut berperan dalam keberlangsungan hidup dan aktivitas kultur sel.⁶⁶⁻⁶⁸ Penelitian ini dapat membuktikan bahwa penggunaan plasma darah sebagai matriks kultur mampu memicu adhesi sel CD34+ darah tepi lebih baik dibandingkan penggunaan fibronektin maupun vitronektin. Hal ini diduga karena kondisi kultur sel CD34+ darah tepi menyerupai kondisi *in vivo* di mana plasma darah mengandung berbagai komponen matriks ekstraseluler dan berbagai faktor pertumbuhan yang berperan masing-masing terhadap adhesi, pertumbuhan, dan perkembangan sel CD34+. Namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui matriks ekstraseluler dan faktor pertumbuhan apa saja yang dominan memengaruhi adhesi, pertumbuhan, dan perkembangan kultur sel CD34+.

5

Kesimpulan

Sel CD34+ darah tepi yang diisolasi menggunakan kombinasi metode densitas dan metode magnetik (MACS) dapat viabel dan mengalami adhesi dengan baik pada kultur yang menggunakan media tanam plasma darah, namun tidak pada kultur yang menggunakan media tanam fibronectin dan vitronektin.

Daftar Pustaka

1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(1):1–25.
2. Ghani L, Susilawati M, Novriani H. Faktor Risiko Dominan Penyakit Jantung Koroner di Indonesia. *Bul Penelit Kesehat.* 2016;44(3):153–64.
3. Burchfield JS, Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenes Tissue Repair.* 2008;1(1):1–11.
4. Dimmeler S, Zeiher AM, Michael D, Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair Find the latest version: Review series Unchain my heart : the scientific foundations of cardiac repair. 2005;115(3):572–83.

5. Hanson KP, Jung JP, Tran QA, Hsu S-PP, Iida R, Ajeti V, *et al.* Spatial and Temporal Analysis of Extracellular Matrix Proteins in the Developing Murine Heart: A Blueprint for Regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2012;19(9–10):1132–43.
6. Srivastava A. Cardiovascular Diseases: Recent Developments in Regenerative Medicine. *J Stem Cell Res Ther*. 2017;3(2):241–4.
7. Chachques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A, Carpentier A. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2005;13(3):287–96.
8. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo K, Li T, Harada M, Miura T, Matsuzaki M EK. Local Implantation of Autologous Bone Marrow Cells for Therapeutic Angiogenesis in Patients with Ischemic Heart Disease. *Jpn Circ J*. 2001;65(September):845–7.
9. Wang H, Li X, Gao S, Sun X, Fang H. Transdifferentiation via transcription factors or microRNAs: Current status and perspective. *Differentiation*. 2015;90(4–5):69–76.
10. Romagnani P, Lasagni L, Romagnani S. Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6(3):193–202.
11. Kato K, Radbruch A. Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. *Cytometry*. 1993 Jan 1;14(4):384–92.
12. Wu MH, Smith SL, Danet GH, Lin AM, Williams SF, Liebowitz DN, *et al.* Optimization of culture conditions to enhance transfection of human CD34+ cells by electroporation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Jul 6;27(11):1201–9.
13. Amin HZ. Terapi Stem cell untuk Infark Miokard Akut. *eJournal Kedokt Indones*. 2013;1(2).
14. Rajala K, Pekkanen-Mattila M, Aalto-Setälä K. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *Stem Cells Int*. 2011;16(8):1663–8.
15. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815–22.

16. Banach K, Halbach MD, Hu P, Hescheler J, Egert U. Development of electrical activity in cardiac myocyte aggregates derived from mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Hear Circ Physio.* 2003;284: 2114–23.
17. Batalov I, Feinberg AW. Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture. *Biomark insight.* 2015;10(S1):71–6.
18. Wang W, Chen X, Houser S, Zeng C. Potential of cardiac stem/progenitor cells and induced pluripotent stem cells for cardiac repair in ischaemic heart disease. *Clin Sci.* 2013;125(7):319–27.
19. Pendyala L, Goodchild T, Gadesam R, Chen J, Robinson K, Chronos N, *et al.* Cellular Cardiomyoplasty and Cardiac Regeneration. *Curr Cardiol Rev.* 2008 May 1;4(2):72–80.
20. Rantam F. *Stem Cell 2: Mesenchymal, hematopoetik, dan model aplikasi.* Surabaya: Airlangga University Press; 2014.
21. Pikir B, Susilowati H, Hendrianto E, Abdulantam F. Reversin Increase the Plasticity of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell for Generation of Cardiomyocyte In Vitro. *Folia Medica Indones.* 2011;47(2):88–93.
22. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral Blood “Endothelial Progenitor Cells” are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation.* 2003;107:1164–9.
23. Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells : isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy.* 2003;5(5):362–9.
24. Ogawa S, Tagawa Y, Kamiyoshi A, Suzuki A, Nakayama J, Hashikura Y, *et al.* Original Article Crucial Roles of Mesodermal Cell Lineages in a Murine Embryonic Stem. *Stem Cells.* 2005;23:903–13.
25. Shiba Y, Hauch KD, Laflamme M. Cardiac Applications for Human Pluripotent Stem Cells. *Curr Pharm Des.* 2009;46(2):220–31.
26. Menon S, Shailendra S, Renda A, Longaker M, Quarto N. An Overview of Direct Somatic Reprogramming : The Ins and Outs of iPSCs. *Int J. Mol Sci.* 2016;17(141):1–20.

27. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005;23(6):699–708.
28. Collins JM, Russell B. Stem Cell Therapy for Cardiac Repair. *J Cardiovasc Nurs.* 2009;24(2):93–7.
29. Loh Y, Agarwal S, Park I, Urbach A, Huo H, Heffner GC, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human blood Brief report Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood.* 2009;113:5476–9.
30. Giorgetti A, Aasen T, Gonzalez F, Vassena R, Raya A, Boué S, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Res.* 2009;5(4):353–7.
31. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules.* 2012;17:6196–236.
32. Yamanaka S. pluripotent stem cell generation. *Nature.* 2009;460(7251):49–52.
33. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R, Bianchi ME, *et al.* Induced pluripotent stem cells : applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3(February):1–18.
34. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
35. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1276–84.
36. Sun Y, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, *et al.* Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38:245–58.
37. Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K, Satomura K, Muto T, Itoh K, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *JBIOSC.* 2010;110(3):345–50.
38. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki N, Takeda-Kawaguchi T, *et al.* Dental Pulp Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. *J Dent Res.* 2010;89(8):773–8.

39. Yamanaka S. Perspective Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):678–84.
40. Dimos JT, Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, *et al*. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science* (80-). 2008;321:1218–21.
41. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, *et al*. Probing sporadic and familial Alzheimer’s disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2012;482(7384):216–20.
42. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Adult Stem Cells and Their Cardiac Potential. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;276(1): 103–12.
43. Xie Z, Hao H, Tong C, Cheng Y, Liu J, Pang Y, *et al*. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Elicit Macrophages into an Anti-Inflammatory Phenotype to Alleviate Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Rats. *Stem Cells*. 2016;34:627–39.
44. Batty JA, Lima JAC, Kunadian V. Direct cellular reprogramming for cardiac repair and regeneration. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(2):145–56.
45. Yeh ETH, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of Human Peripheral Blood CD34⁺-Enriched Cell Population Into Cardiomyocytes, Endothelial Cells, and Smooth Muscle Cells In Vivo. *Circulation*. 2003;108:2070–3.
46. Mackie AR, Losordo DW. CD34-positive stem cells: in the treatment of heart and vascular disease in human beings. *Texas Hear Inst J*. 2011;38(5):474–85.
47. Raab S, Klingenstein M, Liebau S, Linta L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int*. 2014;2014:1–12.
48. Tan H, Toh C, Ma D, Yang B, Liu Y, Lu J, *et al*. Human Finger-Prick Induced Pluripotent Stem Cells Facilitate the Development of Stem Cell Banking. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3:586–98.
49. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. Vol. 32, *Stem Cells*. AlphaMed Press; 2014. p. 1380–9.

50. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013 Jun 18;4(3):71.
51. Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J. Cell separation: Terminology and practical considerations. *J Tissue Eng.* 2013 Sep 2;4(1):204173141247269.
52. Kumar RK, Lykke AWJ. Cell separation: A review. *Pathology.* 1984 Jan 1;16(1):53–62.
53. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum.* 1972;43(3):404–9.
54. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11(2):231–8.
55. Abdal Dayem A, Lee S, Y. Choi H, Cho SG. The Impact of Adhesion Molecules on the In Vitro Culture and Differentiation of Stem Cells. Vol. 13, *Biotechnology Journal.* Wiley-VCH Verlag; 2018. p. 1700575.
56. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. Vol. 1840, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* Elsevier; 2014. p. 2506–19.
57. Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. Vol. 10, *Stem Cell Research and Therapy.* BioMed Central Ltd.; 2019.
58. Molday RS, Yen SPS, Rembaum A. Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells. *Nature.* 1977;268(5619):437–8.
59. Tripathi H, Peng H, Donahue R, Chelvarajan L, Gottipati A, Levitan B, *et al.* Isolation Methods for Human CD34 Subsets Using Fluorescent and Magnetic Activated Cell Sorting: an In Vivo Comparative Study. *Stem Cell Rev Reports.* 2020;16(2):413–23.
60. Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and Application of Magnetic Particles in Cell Isolation and Enrichment. *Rep Prog Phys.* 2015;78(1):016601.

61. Ahrens I, Domeij H, Topcic D, Haviv I, Merivirta RM, Agrotis A, *et al.* Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression. *PLoS One*. 2011;6(8).
62. Yokota T, Oritani K, Mitsui H, Aoyama K, Ishikawa J, Sugahara H, *et al.* Growth-Supporting Activities of Fibronectin on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells In Vitro and In Vivo: Structural Requirement for Fibronectin Activities of CS1 and Cell-Binding Domains. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3263–72.
63. Hordyjewska A, Popiołek Ł, Horecka A. Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. Vol. 67, *Cytotechnology*. Kluwer Academic Publishers; 2015. p. 387–96.
64. Masauzi N, Tanaka J, Kasai M, Yamada M, Saitoh S, Kawamura T, *et al.* Mean fluorescence intensity (MFI) of beta2 integrin (CD11a and CD11b) expression on peripheral blood (PB) CD34-positive (CD34+) cells in steady state correlates inversely with the total amount of harvested CD34+ cells [2]. Vol. 31, *Bone Marrow Transplantation*. Nature Publishing Group; 2003. p. 1069–70.
65. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. *J Exp Med*. 1991 Sep 1;174(3):693–703.
66. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: Distinct and independent functions during tissue repair. Vol. 4, *Fibrogenesis and Tissue Repair*. BioMed Central; 2011. p. 1–17.
67. Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(2).
68. Muraglia A, Nguyen VT, Nardini M, Moggi M, Coviello D, Dozin B, *et al.* Culture medium supplements derived from human platelet and plasma: Cell commitment and proliferation support. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017 Nov 20;5:66.