

## Kajian: Alternatif Pengganti *Trypsin* pada Kultur Sel Punca Mesenkim

Ariyani Noviantari<sup>1\*</sup>, Tati Febrianti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI, Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat, 10560, Indonesia

\*Corresponding author: ariyani.noviantari@gmail.com

**Abstract.** Stem cells have potential as therapeutic cells in various degenerative diseases. This potential must be balanced with the availability of stem cells as cell therapy. In stem cell transplantation to patients, stem cells must meet Good Manufacturing Practice (GMP) standards and Food and Drug Administration regulations. Before being given to patients, Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are cultured using a culture medium and added with certain supplements to reach the required number of cells. To expansion of cells, it is necessary to carry out passages or subcultures using an enzyme. The enzyme that is usually used is trypsin, but this material still contains animal material. Therefore, it is necessary to have a trypsin replacement supplement that is safe to use in MSCs culture for stem cell therapy. This paper describes the alternative of substitute material for trypsin as a free animal supplement in MSCs culture. This paper is a literature review obtained through literature searches obtained from the internet. Papain, TrypLE Select, TrypLE Express, and TrypZean can be used as substitutes for trypsin in MSCs cultures. **Keywords:** culture; mesenchymal stem cells; therapy; trypsin substitute

**Abstrak.** Saat ini, sel punca memiliki potensi sebagai sel terapi pada berbagai penyakit degeneratif. Potensi tersebut harus diimbangi dengan ketersediaan sel punca sebagai sel terapi. Dalam transplantasi sel punca kepada pasien, sel punca harus memenuhi standar *Good Manufacturing Practice* (GMP) dan regulasi dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). Sebelum diberikan ke pasien, sel punca mesenkim (SPM) dikultur menggunakan medium kultur ditambahkan suplemen tertentu agar mencapai jumlah sel yang dibutuhkan. Pada ekspansi dan propagasi SPM, perlu dilakukan pasase atau subkultur menggunakan suatu enzim. Enzim yang biasanya digunakan adalah *trypsin*, namun bahan ini masih mengandung materi hewan. Oleh karena itu diperlukan adanya alternatif suplemen pengganti *trypsin* yang aman digunakan dalam kultur SPM untuk terapi sel punca. Tulisan ini menguraikan tentang alternatif bahan pengganti *trypsin* sebagai suplemen dalam kultur SPM yang bebas dari materi hewan. Tulisan ini berupa review literatur yang didapatkan melalui penelusuran pustaka yang didapatkan dari internet. *Papain*, *TrypLE Select*, *TrypLE Express*, dan *TrypZean* dapat digunakan sebagai pengganti *trypsin* pada kultur SPM.

**Kata kunci:** kultur; pengganti trypsin; sel punca mesenkim; terapi

## 1. Pendahuluan

Sel punca memiliki potensi sebagai sel terapi pada berbagai penyakit degeneratif saat ini. Hal ini disebabkan karena aspek ketersediaan, potensi perbanyakan dan kemampuan diferensiasi yang dimiliki sel punca. Dalam transplantasi sel punca kepada pasien, sel punca harus memenuhi standar *Good Manufacturing Practice* (GMP) dan aturan dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) untuk menghasilkan produk yang berkualitas.<sup>1</sup>

Sel punca adalah sel yang mampu memperbanyak diri (*self renewal*), belum mempunyai bentuk dan fungsi yang spesifik (*undifferentiated*), namun mampu berdiferensiasi menjadi sel lainnya. Salah satu jenis sel punca adalah sel punca mesenkim (SPM). SPM dapat diisolasi dari sumsum tulang, jaringan lemak, darah tali pusat, otot, dan paru-paru. SPM dapat berdiferensiasi menjadi lini jaringan pembentuk lapisan mesoderm seperti osteoblas, kondrosit, dan adiposit, tapi juga lini lapisan ektoderm dan endoderm. Kemampuan SPM yang mampu berdiferensiasi inilah yang menjadi peluang dalam pemanfaatan sel tersebut sebagai sel terapi.<sup>2</sup>

Sebelum diberikan ke pasien, sel punca mesenkim (SPM) dikultur secara *in vitro* menggunakan medium kultur ditambahkan suplemen tertentu agar mencapai jumlah sel yang dibutuhkan. Medium kultur digunakan sebagai nutrisi pertumbuhan dan diferensiasi sel, suplemen medium digunakan untuk mengoptimalkan kondisi kultur sedangkan bahan penunjang lainnya berperan penting dalam subkultur.<sup>3-5</sup>

Untuk mencapai jumlah yang diinginkan, perlu dilakukan pasase atau subkultur yang menggunakan suatu enzim. Enzim yang biasanya digunakan adalah *trypsin*-EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*).<sup>6,7</sup> Penggunaan *trypsin* tidak memenuhi standar karena bahan ini masih mengandung materi hewan. *Trypsin* diperoleh dari sekresi kelenjar pankreas sapi ataupun babi<sup>8</sup>.

Penggunaan materi hewan pada kultur sel yang akan digunakan untuk tranplantasi kemungkinan dapat memicu respon imunologis karena adanya kontaminasi senyawa bahan asing berupa virus, bakteri, jamur dan endotoksin. Penggunaan *trypsin* memungkinkan adanya kontaminasi produk sel untuk terapi oleh virus dan patogen dari mamalia.<sup>8</sup> Oleh karena itu diperlukan adanya suplemen pengganti *trypsin* yang aman digunakan dalam kultur SPM untuk keperluan terapi sel. Kajian ini bertujuan untuk memberikan informasi terkait alternatif bahan-bahan yang dapat menggantikan *trypsin* sebagai suplemen dalam kultur SPM yang bebas dari materi hewan.

## 2. Metode

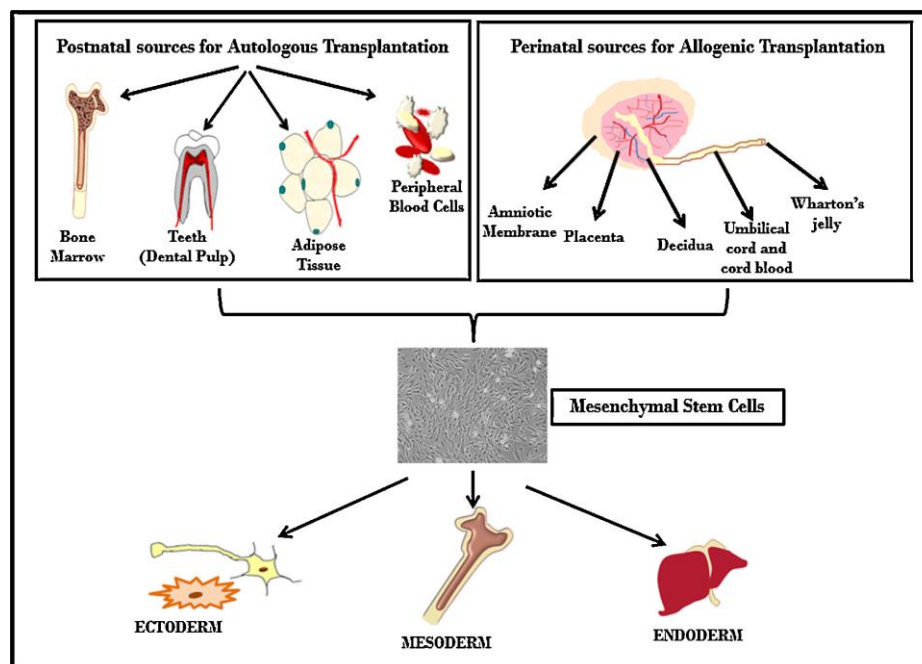
Kajian ini merupakan assessment laporan atau artikel penelitian mengenai alternatif pengganti *trypsin* pada kultur sel punca mesenkim yang telah dipublikasikan di berbagai jurnal ilmiah. Kajian ini diawali dengan mengumpulkan referensi melalui internet dan selanjutnya melakukan kajian literatur yang berkaitan. Literatur yang dikaji diperoleh dari jurnal, buku dan laporan penelitian dari dalam dan luar negeri di antara tahun 2011 hingga 2021, untuk referensi sebelum tahun 2011 yang masih relevan tetap digunakan sebagai rujukan. Jumlah literatur yang dikaji adalah 38. Artikel penelitian yang dikaji mencakup sel punca mesenkim (SPM), kultur sel punca mesenkim (SPM) secara *in vitro*, *trypsin*, dan pengganti *trypsin*.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Sel punca mesenkim (SPM)

Sel punca didefinisikan sebagai sel yang belum berdiferensiasi tetapi memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi sel lain dan mampu mempertahankan kemampuan memperbarui dirinya sendiri.<sup>9</sup> SPM termasuk sel punca dewasa yang dapat diisolasi dari jaringan dewasa maupun jaringan fetus. Dari jaringan dewasa, SPM dapat diisolasi dari sumsum tulang, gigi, darah perifer, dan jaringan lemak, sedangkan dari jaringan fetus, SPM dapat diisolasi dari membran amnion, plasenta, darah tali pusat dan *Wharton jelly* (Gambar 1). Bila dikultur, morfologi SPM mirip seperti fibroblast (*fibroblast like cell*).<sup>10,11</sup>

Sel punca mesenkim (SPM) harus memiliki 3 kriteria menurut *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*. Kriteria pertama adalah sel mampu melekat pada dasar wadah kultur plastik (*plastic-adherent*) dalam medium kultur standar. Kriteria kedua adalah sel mampu mengekspresikan marker CD105, CD73, CD90 dan tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79alpha atau CD19 dan HLA-DR pada permukaan sel. Kriteria ketiga adalah sel punca mesenkim dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit dan kondroblas secara *in vitro*.<sup>12</sup>



Gambar 1. Sumber SPM dan potensi diferensiasinya<sup>11</sup>

### 3.2. Kultur sel punca mesenkim (SPM) secara *in vitro*

Isolasi dan kultur sel punca membutuhkan medium basal (dasar), suplemen (bahan tambahan), larutan, garam dan bahan tambahan lainnya. Medium basal adalah medium yang berfungsi untuk mendukung produktivitas dan pertumbuhan sel. Medium basal yang biasa digunakan untuk isolasi sel punca adalah *alfa-modified essential medium* ( $\alpha$ -MEM), *Dulbecco's modified essential medium* (DMEM), medium Iscoves, Ham F12, dan lain-lain. Saat ini terdapat medium khusus untuk kultur sel punca, seperti MesenCult untuk medium sel punca mesenkim, MethoCult untuk medium sel punca hematopoietik dan sebagainya.<sup>13-16</sup>

Kultur sel punca memerlukan suplemen untuk menunjang proliferasi sel, misalnya sistem dapar (buffer), serum, glutamin, dan faktor pertumbuhan. Sistem buffer digunakan untuk pengaturan pH supaya pertumbuhan sel punca dapat optimal, yaitu dengan penambahan natrium bikarbonat atau larutan Hepes. Serum berperan dalam sintesis protein. Serum dapat mengandung albumin, asam amino, vitamin, atau faktor pertumbuhan. Dalam kultur sel punca dapat digunakan *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Fetal Calf Serum* (FCS), *Newborn Calf Serum* (NCS) dan lain-lain. Glutamin merupakan prekursor penting dalam sintesis protein dan sebagai bahan bakar respirasi sel. Glutamin terdiri dari asam amino yang tidak stabil dan bisa mengalami perubahan menjadi amonia yang dapat bersifat toksik bila terakumulasi. Oleh sebab itu, glutamin harus ditambahkan sesaat sebelum medium digunakan.<sup>10</sup>

Dalam kultur SPM juga dibutuhkan larutan garam, seperti *balanced salt solution* (BSS) dan *phosphat buffer saline* (PBS) untuk mengatur pH dan tekanan osmotik. Selain itu, diperlukan bahan lainnya seperti antibiotik dan antijamur untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur. Antibiotik atau

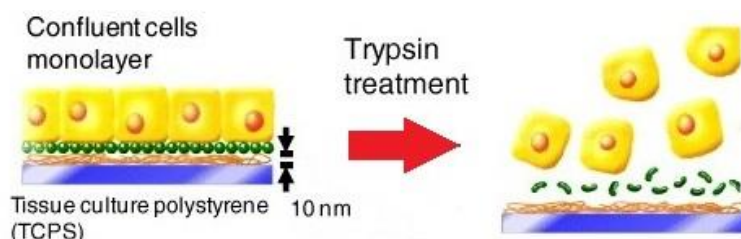
antijamur yang sering digunakan untuk kultur sel punca adalah *Penicillin*, *Streptomycin*, *Gentamycin*, *Fungizone* dan lain-lain.<sup>16</sup>

Bahan lain yang diperlukan dalam kultur sel punca adalah enzim untuk isolasi dan sub kultur atau pasase. Enzim *trypsin* dapat digunakan untuk subkultur, sedangkan kolagenase dan dispase dapat digunakan untuk isolasi sel punca dengan metode enzimatik, misalnya isolasi sel punca mesenkim dari Wharton jelly atau jaringan lemak. Peran kolagenase dan dispase adalah menghilangkan matriks ekstraseluler yang mengikat atau menyatukan sel, sehingga sel punca dapat terpisah dari matriks ekstraseluler tersebut. Dispase juga dapat digunakan untuk memisahkan sel punca dengan jaringannya dan dapat mencegah terbentuknya kelompok sel dalam suspensi sel.<sup>17,18</sup>

### 3.3. *Trypsin*

SPM yang dikultur dalam medium kultur akan tumbuh melekat pada wadah kultur sampai konfluen. *Trypsin/EDTA* (*ethylene diamine tetraacetic acid*) merupakan salah satu bahan yang sering digunakan dalam kultur sel untuk subkultur atau melepaskan SPM dari permukaan dasar kultur pada petridish atau flask. *Trypsin* akan memutuskan adhesi antara molekul-molekul di antara sel yang melekat pada wadah kultur sedangkan EDTA berfungsi untuk mengurangi konsentrasi ion logam yang dapat menghambat *trypsin*.<sup>19</sup>

Sel yang konfluen akan melekat erat pada wadah kultur sehingga membentuk sel yang *monolayer*. Pada disosiasi sel dengan *trypsin*, akan terjadi kerusakan membran sel dan terjadi hidrolisis pada matriks ekstraseluler sehingga sel yang tadinya saling menempel menjadi sel tunggal (Gambar 2). Disosiasi sel dengan *trypsin* dapat menyebabkan viabilitas sel menurun karena adanya kerusakan pada membran dan matriks ekstraseluler. Disosiasi sel juga dapat dilakukan dengan *cell scrapers*.<sup>20,21</sup>



Gambar 2. Disosiasi sel dengan *trypsin*<sup>21</sup>

*Trypsin* diisolasi dari sekresi kelenjar pankreas babi sehingga mengandung materi hewan yang dapat menjadi sumber kontaminasi virus dan bakteri. Turunan protein dari hewan dapat bersifat infeksius dan mempengaruhi respons imun dalam pengobatan SPM. Hal inilah yang menyebabkan penggunaan *trypsin* dihindari dalam aplikasi SPM pada penyakit degeneratif karena tidak sesuai dengan GMP pada produksi SPM.<sup>22</sup>

### 3.3 Pengganti *trypsin*

Beberapa bahan yang dapat menggantikan fungsi *trypsin* dalam disosiasi sel (Tabel 1) adalah sebagai berikut :

#### 3.3.1 *TrypZean*

*TrypZean* adalah *reagent* yang biasanya digunakan dalam kultur sel hewan. *TrypZean* merupakan suatu enzim rekombinan *trypsin* yang merupakan turunan produk dari jagung dan bersifat *animal-free* sehingga diharapkan bebas kontaminasi dari sel hewan.<sup>23-25</sup>

#### 3.3.2 *TrypLE*

*TrypLE* adalah suatu enzim rekombinan *trypsin* dari turunan bakteri (hasil fermentasi bakteri) yang dapat menggantikan fungsi *trypsin/EDTA* untuk disosiasi SPM.<sup>22,23,26</sup> Ada 2 merk *TrypLE* yaitu *TrypLE Select* dan *TrypLE Express*. *TrypLE Select* (TS) direkomendasikan dalam aplikasi

klinik terutama produksi kecantikan. TS memiliki sifat yang mirip *trypsin* baik dari segi kinetika dan spesifisitasnya. TS dilaporkan lebih stabil pada suhu ruang dibandingkan *trypsin* dan lebih mudah digunakan. TS diproduksi pada fasilitas GMP yang sudah teregistrasi oleh BPOM Amerika. Enzim ini dapat mengeliminasi kemungkinan transmisi virus dari hewan ke pasien. TS dapat digunakan untuk disosiasi berbagai sel mamalia yang bebas serum.<sup>27,28</sup>

### 3.4 Papain

Papain adalah enzim yang berasal dari metabolit sekunder pepaya (*Carica papaya* L.) yang dapat mendekomposisi protein pada konsentrasi yang rendah dan bersifat tidak toksik terhadap sel. Papain dapat mendisosiasi sel kortikal pada neuron dengan konsentrasi 30 µg/mL dan 20 µg/mL pada suhu 37°C selama 40 menit.<sup>29</sup> Papain juga dilaporkan dapat mendisosiasi sel neuron dan glial dari tikus yang baru lahir.<sup>30</sup>

**Tabel 1.** Beberapa penelitian disosiasi SPM menggunakan bahan pengganti *trypsin*

No	Pengganti <i>Trypsin</i>	Sumber SPM	Hasil	Referensi
1	Papain	Sel punca neuron	Dapat terdisosiasi	Choi et al (2008) <sup>31</sup>
2	<i>TrypLE Select</i> atau <i>Express</i>	SPM dari jaringan lemak manusia	Dapat terdisosiasi	Lindroos et al (2009) <sup>32</sup>
3	<i>TrypLE™ Express</i>	SPM dari sumsum tulang manusia	Dapat terdisosiasi	Chase, et al (2010) <sup>33</sup>
4	<i>TrypLE Express</i>	SPM dari darah tali pusat manusia	Dapat terdisosiasi	Kim, et al (2010) <sup>34</sup>
5	<i>TrypLE</i> , <i>TrypZean</i> , <i>Trypsin</i> (Kontrol)	SPM dari jaringan lemak manusia	Dapat terdisosiasi	Carvalho et al (2010) <sup>23</sup>
6	<i>TrypLE</i> , <i>TrypZean</i> , <i>Trypsin</i> (Kontrol)	SPM dari jaringan lemak manusia	Dapat terdisosiasi	Carvalho et al (2011) <sup>22</sup>
7	<i>Accutase</i> , <i>Alfazyme</i> , <i>TrypZean</i> , <i>Trypsin</i> (Kontrol)	hMSC cell line (hMSC-TERT)	Hanya <i>TrypZean</i> yang dapat mendisosiasi hMSC-TERT	Salzig et al (2013) <sup>24</sup>
8	<i>TrypLE Select</i>	SPM dari lipoaspirat (SPL)	Dapat terdisosiasi	Suryani, et al (2013) <sup>35</sup>
9	Papain-EDTA	Sel punca/progenitor neuron	Dapat terdisosiasi	Mothe, et al (2015) <sup>36</sup>
10	<i>TrypLE</i>	<i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> (SHED)	Dapat terdisosiasi	Zhang, et al (2016) <sup>37</sup>
11	Papain, <i>Trypsin</i> (Kontrol)	SPM dari sumsum tulang tikus	Dapat terdisosiasi	Noviantari, et al (2019) <sup>38</sup>

## 4. Kesimpulan

Papain, *TrypLE Select*, *TrypLE Express*, dan *TrypZean* dapat digunakan sebagai pengganti *trypsin* pada kultur sel punca mesenkim (SPM).

## 5. Ucapan Terimakasih

Terima kasih disampaikan kepada para peneliti di Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan yang telah memberikan suasana kondusif dalam penelitian dan pengembangan serta ucapan terimakasih kepada semua pihak yang telah memberi masukan yang membangun dalam penulisan artikel ini.

## 6. Referensi

- [1] Giancola R, Bonfini T, Iacone A. Cell therapy: cGMP facilities and manufacturing. *Muscles, Ligament Tendons J.* 2012;2(3):243-247.
- [2] Wei X, Yang X, Han Z-P, Qu F-F, Shao L, Shi Y-F. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34:747-754. doi:10.1038/aps.2013.50
- [3] Tavakolinejad S, Khosravi M, Mashkani B, et al. The effect of Human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Iran Biomed J.* 2014;18(3):150-156. doi:10.6091/ibj.1301.2014
- [4] Oikonomopoulos A, van Deen WK, Manansala A-R, et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep.* 2015;5:16570. doi:10.1038/srep16570
- [5] Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, et al. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1-16. doi:10.3390/ijms20071656
- [6] Fong D, Duceppe N, Hoemann CD. Mesenchymal stem cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for in vitro chemotaxis and adhesion assays. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;484(3):656-661. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.171
- [7] Salzig D, Schmiermund A, P. Grace P, Elseberg C, Weber C, Czermak P. Enzymatic Detachment of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Grown on Glass Carriers in a Bioreactor. *Open Biomed Eng J.* 2014;7(1):147-158. doi:10.2174/1874120701307010147
- [8] Krishnan A, Woodard SL. TrypZean™: An Animal-Free Alternative to Bovine Trypsin. In: Howard J, Hood E, eds. *Commercial Plant-Produced Recombinant Protein Products, Biotechnology in Agriculture and Forestry.* 68th ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2014:43-63. doi:10.1007/978-3-662-43836-7
- [9] Kaveh K, Ibrahim R, Bakar MZ, Ibrahim Tengku A. Mesenchymal Stem Cells, Osteogenic Lineage and Bone Tissue Engineering: A Review. *J Anim Vet Adv.* 2011;10(17):2317-2330. doi:10.3923/javaa.2011.2317.2330
- [10] Rantam F, et al. *Stem Cell Exploration Method of Isolation and Culture. 1st Edition.* Surabaya: Airlangga University Press; 2009.
- [11] Bhone RR, Sheshadri P, Sharma S, Kumar A. Making surrogate  $\beta$ -cells from mesenchymal stromal cells: Perspectives and future endeavors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;46:90-102. doi:10.1016/j.biocel.2013.11.006
- [12] Dominici M, Blanc K Le, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
- [13] Al-Saqi SH, Saliem M, Asikainen S, et al. Defined serum-free media for in vitro expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2014;16(7):915-926. doi:10.1016/j.jcyt.2014.02.006
- [14] Pieri L, Urbani S, Mazzanti B, et al. Human mesenchymal stromal cells preserve their stem features better when cultured in the Dulbecco's modified Eagle medium. *Cytotherapy.* 2011;13(5):539-548. doi:10.3109/14653249.2010.542459
- [15] Vito A Di, Giudice A, Chiarella E, Malara N, Bennardo F, Fortunato L. In Vitro Long-Term Expansion and High Osteogenic Potential of Periodontal Ligament Stem Cells: More Than a Mirage. *Cell Transplant.* 2019;28(1):129-139. doi:10.1177/0963689718807680

- [16] Nazarof I, Lee J, Soupene E, Etemad S, Knapik D, Green W. Multipotent Stromal Stem Cells from Human Placenta Demonstrate High Therapeutic Potential. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:359-372.
- [17] Miersch C, Stange K, Röntgen M. 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. *Vitr Cell Dev Biol.* 2018;54:406-412.
- [18] Ferrua C, Centeno E, Rosa L, et al. How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. *Braz Oral Res.* 2017;31:1-9.
- [19] Motyan JA, Toth F, Tozser J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules.* 2013;3:923-942. doi:10.3390/biom3040923
- [20] Kurashina Y, Imashiro C, Hirano M, et al. Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic traveling waves. *Commun Biol.* 2019;2(393):1-11. doi:10.1038/s42003-019-0638-5
- [21] Kobayashi J, Okano T. Fabrication of a thermoresponsive cell culture dish: a key technology for cell sheet tissue engineering. *Sci Technol Adv Mater.* 2010;11(1):1-12. doi:10.1088/1468-6996/11/1/014111
- [22] Carvalho PP, Wu X, Yu G, et al. Use of animal protein-free products for passaging adherent human adipose-derived stromal/stem cells. *Cytotherapy.* 2011;13(5):594-597. doi:10.3109/14653249.2010.544721
- [23] Carvalho PP, Gimble JM, Dias IR, Gomes ME, Reis RL. Human Adipose-Derived Stromal / Stem Cells : Use of Animal Free Products and Extended Storage At Room Temperature. *Stem Cells.* 2010:2-3.
- [24] Salzig D. Enzymatic Detachment of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Grown on Glass Carriers in a Bioreactor. *Open Biomed Eng J.* 2013;7(1):147-158. doi:10.2174/1874120701307010147
- [25] Rikno H. Tanaman sebagai bioreaktor protein farmaseutik. *BioTrends.* 2018;9(1):25-34.
- [26] Lechanteur C, Briquet A, Giet O, Delloye O, Baudoux E, Beguin Y. Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: A large banking experience. *J Transl Med.* 2016;14(1):1-15. doi:10.1186/s12967-016-0892-y
- [27] Manira M, Anuar KK, Seet WT, et al. Comparison of the effects between animal- derived trypsin and recombinant trypsin on human skin cells proliferation, gene and protein expression. *Cell Tissue Bank.* 2014;15(1):41-49. doi:10.1007/s10561-013-9368-y
- [28] Aghayan H, Goodarzi P, Arjmand B. GMP-Compliant Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cellular Therapy. In: *Methods in Molecular Biology: Stem Cells and Good Manufacturing Practices.* ; 2014:93-107. doi:10.1007/7651
- [29] Rozman-Pungercar J, Kopitar-Jerala N, Bogoyo M TD. Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors : when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ.* 2003;10:881-888. doi:10.1038/sj.cdd.4401247
- [30] Kaiser O, Aliuos P, Wissel K, et al. Dissociated Neurons and Glial Cells Derived from Rat Inferior Colliculi after Digestion with Papain. *PLoS One.* 2013;8(12):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0080490
- [31] Choi K-C, Yoo D-S, Cho K-S, Huh P-W, Kim D-S, Park C-K. Effect of single growth factor and growth factor combinations on differentiation of neural stem cells. *J Korean Neurosurg Soc.* 2008;44(6):375-381. doi:10.3340/jkns.2008.44.6.375
- [32] Lindroos B, Boucher S, Chase L, et al. Serum-free , xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy.* 2009;11(7):958-972. doi:10.3109/14653240903233081
- [33] Chase LG, Lakshmiopathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(8):1-11. doi:10.1186/srct8
- [34] Kim S, Min W, Chun S, et al. Protein Expression Profiles during Osteogenic Differentiation of

- Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood Protein Expression Profiles during Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221:141-150. doi:10.1620/tjem.221.141
- [35] Suryani D, Pawitan JA, Lilianty J, Purwoko RY, Liem IK, Damayanti L. Comparison of fetal bovine serum and platelet-rich plasma on human lipoaspirate-derived mesenchymal stem cell proliferation. *Med J Indones.* 2013;22:146-151.
- [36] Mothe A, Tator CH. Isolation of Neural Stem/Progenitor Cells from the Periventricular Region of the Adult Rat and Human Spinal Cord. *J Vis Exp.* 2015;(99):1-8. doi:10.3791/52732
- [37] Zhang N, Chen B, Wang W, et al. Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Mol Med Rep.* 2016;14:95-102. doi:10.3892/mmr.2016.5214
- [38] Noviantari A, Novianti R, Rinendyaputri R. Comparison of dissociation capability of papain (*Carica papaya* L.) and trypsin on rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMMSCs) culture (preliminary study). In: Sujuti H, Khotimah H, Budianto WY, eds. *International Conference on Bioinformatics and Nano-Medicine from Natural Resources for Biomedical Research.* AIP Publishing; 2019:1-7.