

Kajian: Isolasi Sel Punca Mesenkim dari *Wharton Jelly* Tali Pusat Manusia

Ariyani Noviantari¹ *, Khariri¹

Email : ariyani.noviantari@gmail.com

Abstract. *Stem cells are self-renewal cells, that have no specific shape and function but can differentiate into other cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) can be isolated from a variety of sources, including fatty tissue, bone marrow, Wharton Jelly, umbilical cord blood, dental pulp, and others. MSCs can differentiate into different cell types but are limited to just one cell group by expressing multiple specific or multipotent markers. This paper is a review of the literature through a literature search obtained from the internet on various ways in isolation and differentiation ability of MSCs from human WJ, as well as the application of MSCs from human WJ to degenerative diseases. MSCs isolated from human WJ can be isolated by explant method, enzymatic method, and enzymatic-explant method which can express some specific markers. MSCs from the human WJ can differentiate into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. Therefore, MSCs have great potential in the treatment of degenerative diseases.*

Keywords: *differentiation, isolation, culture, mesenchymal stem cells, Wharton Jelly*

Abstrak. Sel punca merupakan sel yang dapat memperbanyak diri (*self-renewal*), belum mempunyai bentuk dan fungsi yang spesifik, tetapi mampu berdiferensiasi menjadi sel lainnya. Sel punca mesenkim (SPM) dapat diisolasi dari berbagai sumber, yaitu dari jaringan lemak, sumsum tulang, *Wharton Jelly*, darah tali pusat, pulpa gigi, dan lain-lain. SPM dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel tetapi terbatas hanya satu golongan sel saja dengan mengekspresikan beberapa penanda spesifik atau bersifat multipoten. Tulisan ini merupakan review literatur melalui penelusuran pustaka yang didapatkan dari internet tentang berbagai cara dalam isolasi dan kemampuan diferensiasi SPM dari WJ tali pusat manusia, serta aplikasi SPM dari WJ tali pusat manusia terhadap penyakit degeneratif. SPM yang diisolasi dari WJ tali pusat manusia dapat diisolasi dengan metode eksplan, metode enzimatis, dan metode enzimatis-eksplan yang dapat mengekspresikan beberapa penanda spesifik. SPM dari WJ tali pusat manusia mampu berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, dan adiposit. Oleh sebab itu, SPM berpotensi besar dalam terapi penyakit degeneratif.

Kata kunci: diferensiasi; isolasi; kultur; sel punca mesenkim; *Wharton Jelly*

1. Pendahuluan

Sel punca mampu memperbanyak diri (*self renewal*), belum mempunyai bentuk dan fungsi yang spesifik (*undifferentiated*), namun mampu berdiferensiasi menjadi sel lainnya. Sel punca dapat dibedakan menjadi sel punca embrionik, sel punca dewasa, dan sel punca yang diinduksi menjadi sel pluripoten (*induced pluripotent stem cells* - iPSCs).^{1,2} 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 jaringan pembentuk lapisan mesoderm seperti osteoblas, kondrosit, dan adiposit, tapi juga lapisan ektoderm dan endoderm. Kemampuan SPM yang mampu berdiferensiasi inilah yang menjadi peluang dalam pemanfaatan sel tersebut sebagai sel terapi pada berbagai penyakit degeneratif.^{3,4} Salah satu sumber SPM adalah SPM dari *Wharton Jelly* (WJ) tali pusat. SPM yang diisolasi dari matriks tali pusat ini berasal dari jaringan ekstra embrionik yang dilaporkan memiliki sifat multipoten yang lebih baik dibandingkan dari jaringan dewasa lainnya. Isolasi SPM dari sumsum tulang menggunakan cara yang invasif. Sedangkan untuk mendapatkan SPM dari WJ tali pusat ini juga sangat mudah dan tidak invasif dibandingkan SPM dari sumber lainnya, seperti jaringan lemak atau sumsum tulang.⁵ Saat ini, banyak metode yang digunakan dalam isolasi SPM dari WJ tali pusat.

Oleh sebab itu, tulisan ini akan menguraikan tentang berbagai cara dalam isolasi dan kemampuan diferensiasi SPM dari WJ tali pusat manusia, serta aplikasi SPM dari WJ tali pusat manusia terhadap penyakit degeneratif.

2. Metode

Kajian ini merupakan assessment laporan atau artikel penelitian mengenai isolasi dan kemampuan diferensiasi SPM dari WJ tali pusat manusia, serta aplikasi SPM dari WJ tali pusat manusia terhadap penyakit degeneratif 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 2012 hingga 2022, untuk referensi sebelum tahun 2012 yang masih relevan tetap digunakan sebagai rujukan. Jumlah literatur yang dikaji adalah 33. Artikel penelitian yang dikaji mencakup isolasi dan kultur SPM dari WJ tali pusat manusia, kemampuan diferensiasi, serta aplikasi SPM dari WJ tali pusat manusia terhadap penyakit degeneratif.

3. Hasil dan Pembahasan

Sel Punca

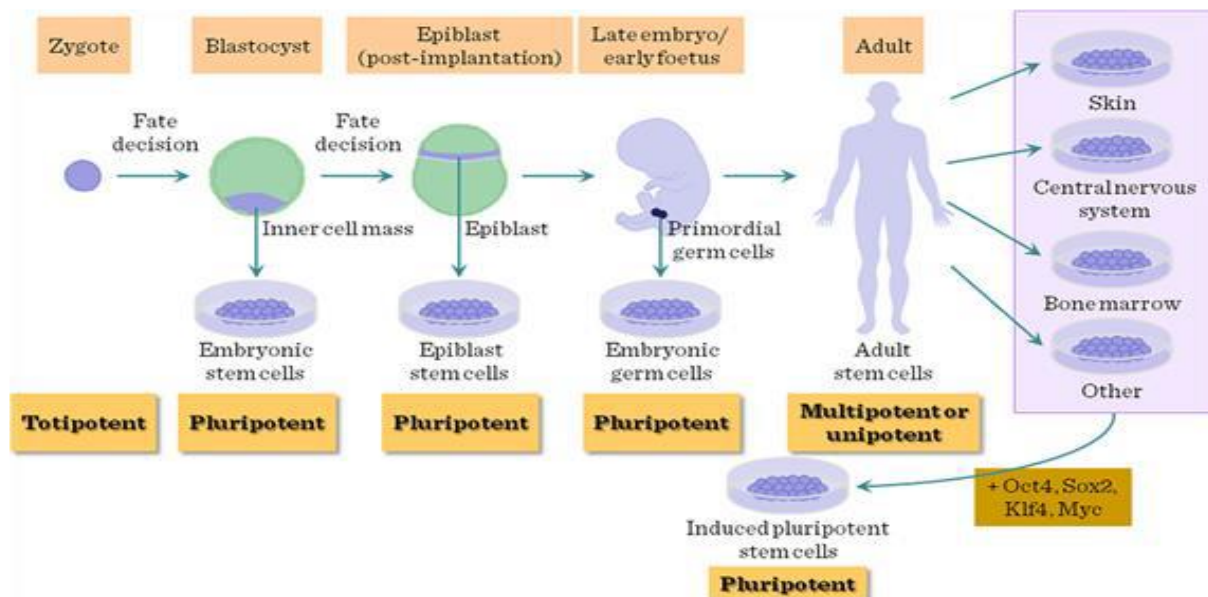
Sel punca merupakan sel yang belum berdiferensiasi tetapi memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi sel lain dan mampu mempertahankan kemampuan memperbarui dirinya sendiri.⁶

Berdasarkan kemampuan berdiferensiasinya⁷ (Gambar 1), sel punca dapat dibagi menjadi :

- a. Sel punca totipoten, merupakan sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel, baik menjadi sel embrionik ataupun sel ekstra embrionik. Sel ini diproduksi dari gabungan sel telur dan sel sperma. Contoh: telur yang telah terfertilisasi menjadi zigot.
- b. Sel punca pluripoten, merupakan sel punca yang merupakan turunan dari sel punca totipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi hampir seluruh jenis sel, yaitu menjadi 3 lapisan germinal yaitu ektoderm, mesoderm, dan endoderm, tapi tidak dapat menjadi jaringan ekstra embrionik seperti plasenta dan tali pusat. Contoh: sel punca embrionik.
- c. Sel punca multipoten, merupakan sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel, tapi terbatas dalam satu golongan sel saja. Contoh: sel punca mesenkim (SPM) dan sel punca hematopoietik.
- d. Sel punca unipoten, merupakan sel punca yang hanya dapat berdiferensiasi menjadi 1 jenis sel saja tetapi masih memiliki sifat dapat memperbarui diri atau meregenerasi dirinya sendiri. Contoh: adalah sel punca otot.⁸

Berdasarkan sumbernya, ada dua macam sel punca⁹ yaitu :

- a. Sel punca embrionik, merupakan sel punca yang bersumber dari embrio pada tahap perkembangan sebelum terjadinya implantasi di uterus. Umur embrio yang digunakan adalah 4-5 hari pada fase blastosit setelah fertilisasi. Sel punca embrionik memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi semua jenis sel pada tubuh, memiliki kemampuan memperbarui dirinya sendiri, dan bersifat pluripoten.
- b. Sel punca dewasa, merupakan sel punca yang belum berdiferensiasi dan dapat ditemukan di seluruh tubuh. Sel punca dewasa pertama kali ditemukan di sumsum tulang, yaitu sel punca hematopoietik yang dapat menghasilkan seluruh sel darah merah, sel darah putih, dan keping darah. Sel punca dewasa dapat diisolasi dari berbagai sumber jaringan seperti sumsum tulang, jaringan lemak, *Wharton Jelly* tali pusat, pulpa gigi dan lain-lain. Sifat sel punca dewasa adalah multipoten, misalnya adalah sel punca mesenkim, sel punca jaringan lemak, sel punca hematopoietik, dan sel punca endotel.



Gambar 1. Sumber dan sifat sel punca⁹

Sel punca mesenkim (SPM)

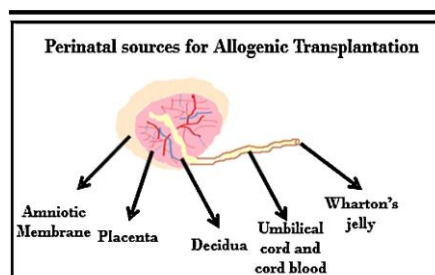
SPM termasuk sel punca dewasa yang dapat diisolasi dari jaringan dewasa maupun jaringan fetus. Dari jaringan dewasa, SPM dapat diisolasi dari sumsum tulang, gigi, darah perifer, dan jaringan lemak, sedangkan dari jaringan fetus, SPM dapat diisolasi dari membran amnion, plasenta, darah tali pusat dan WJ tali pusat (Gambar 2). Bila dikultur, morfologi SPM mirip seperti fibroblast (*fibroblast like cell*).^{8,10}

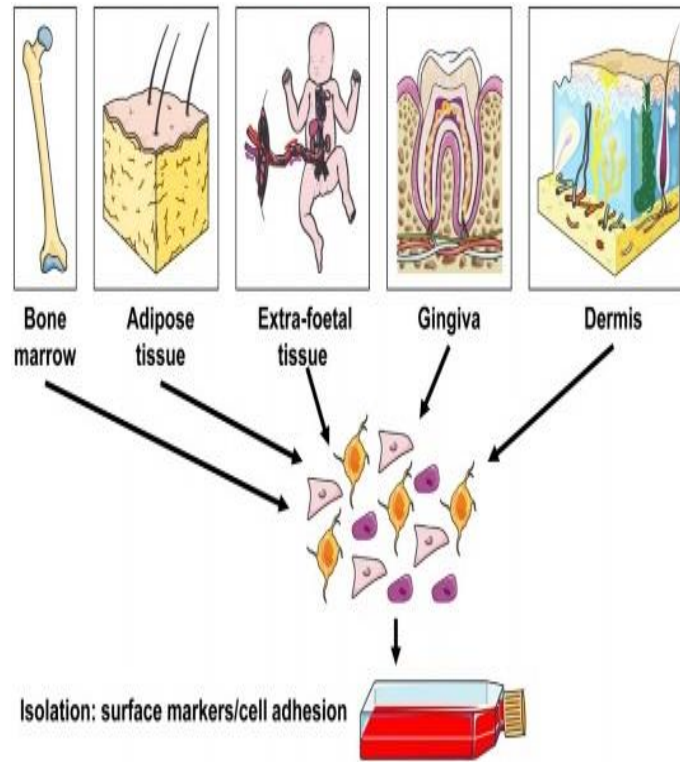
Sel punca mesenkim (SPM) harus memiliki 3 kriteria menurut *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*. Kriteria pertama adalah sel mampu melekat pada dasar wadah kultur plastik (*plastic-adherent*) dalam medium kultur standar. Kriteria kedua adalah 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*.¹¹

Wharton Jelly (WJ) tali pusat

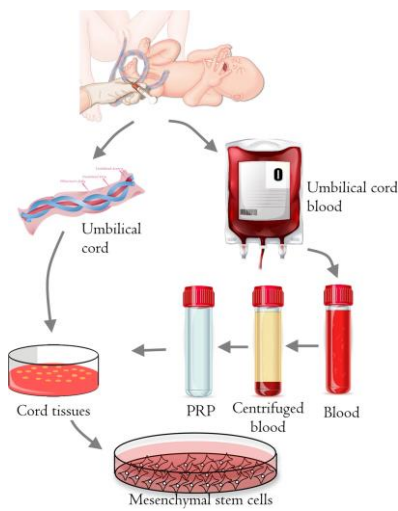
Salah satu sumber SPM adalah dari jaringan fetus yang dapat diambil dari plasenta, tali pusat, dan darah tali pusat bayi yang baru lahir serta merupakan sel punca dewasa (Gambar 3). Sel punca dari darah tali pusat mengandung sel punca hematopoietik, SPM, dan sel progenitor endotel yang mempunyai kemampuan multipoten dan tingkat proliferasinya lebih baik daripada SPM dari sumsum tulang. Selain itu, SPM dari darah tali pusat memiliki sifat immunogenisitas yang lebih rendah dan isolasinya tidak membutuhkan prosedur yang invasif karena jaringan fetus dianggap sebagai “limbah” yang tidak digunakan lagi setelah bayi dilahirkan.¹²

Dari tali pusat bayi yang baru lahir, dapat diambil pula matriks tali pusat berupa suatu jaringan gelatinosa di dalam tali pusat yang berasal dari jaringan mesoderm ekstra-embriionik. Jaringan ini disebut *Wharton Jelly (WJ)*. Jaringan ikat pada matriks tali pusat ini memiliki dua arteri dan vena (Gambar 4 dan 5). WJ merupakan matriks jaringan ikat mukosa yang terletak antara sub-amnion dan perivaskular yang terdiri dari fibroblas, serat kolagen, dan proteoglikan.¹³





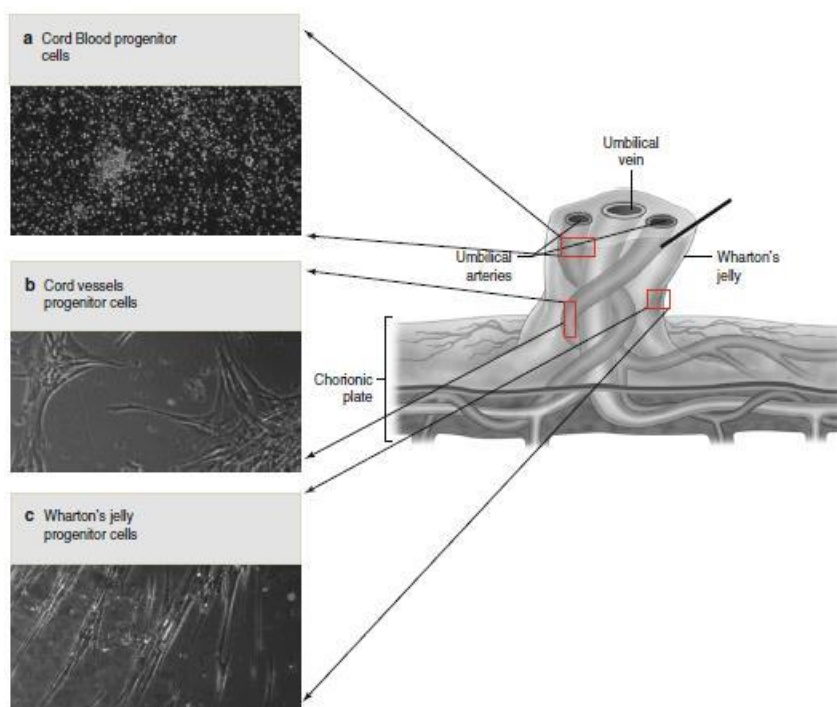
Gambar 2. Sumber SPM dan potensi diferensiasinya^{10,14}



Gambar 3. Sumber SPM dari tali pusat bayi¹²



Gambar 4. Deskripsi WJ tali pusat¹⁴



Gambar 5. Sel punca/progenitor asal tali pusat¹⁵

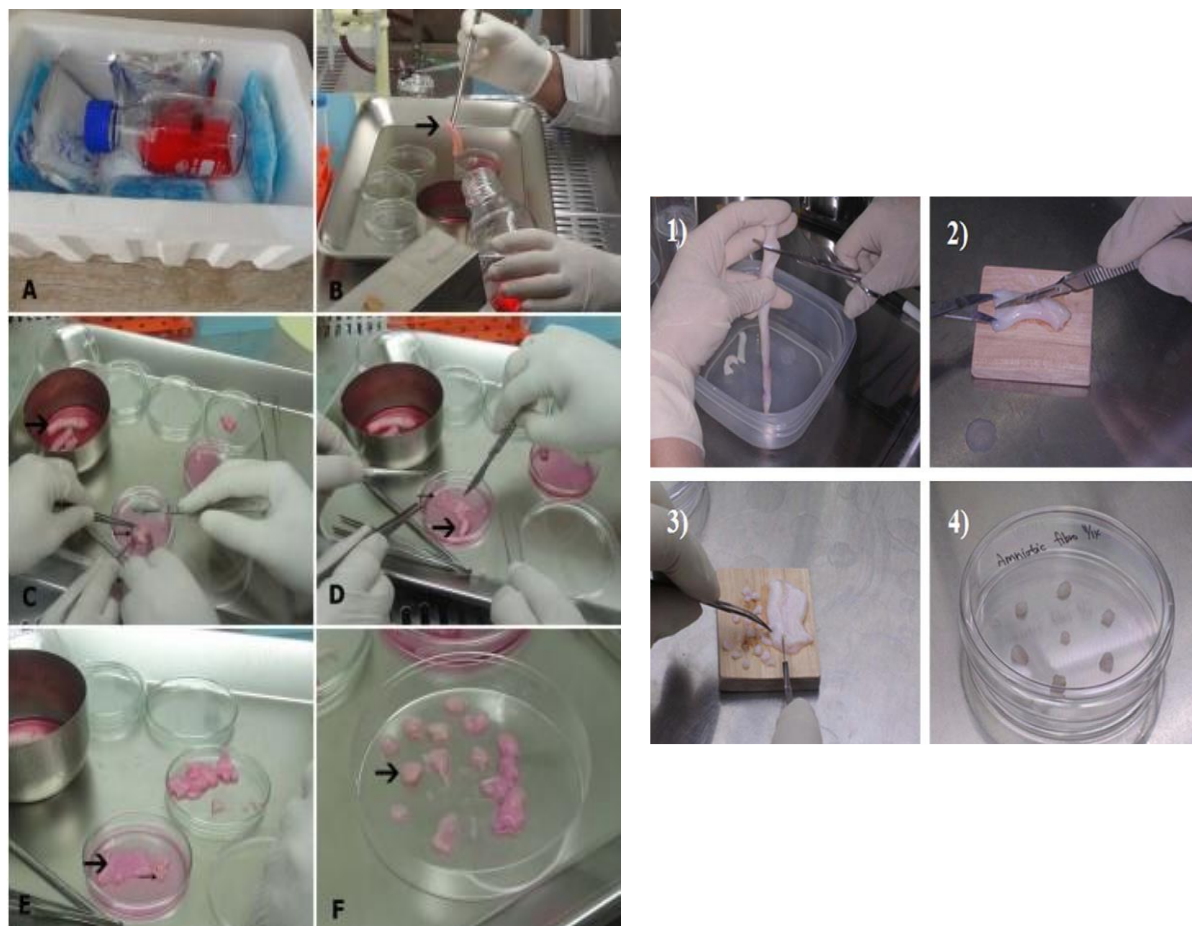
Isolasi sel punca mesenkim (SPM) dari WJ tali pusat secara in vitro

Isolasi dan kultur SPM dari WJ tali pusat membutuhkan medium basal (dasar), suplemen (bahan tambahan), larutan, garam dan bahan tambahan lainnya. Medium basal (dasar) merupakan medium yang mendukung pertumbuhan sel. Medium basal (dasar) yang biasa digunakan untuk isolasi SPM dari WJ tali pusat adalah *alfa-modified essential medium* (α -MEM), *Dulbecco's modified essential medium* (DMEM), medium Iscoves, Ham F12, dan lain-lain.¹⁶⁻¹⁹

Beberapa metode isolasi SPM dari WJ tali pusat adalah sebagai berikut:

a. Metode eksplan

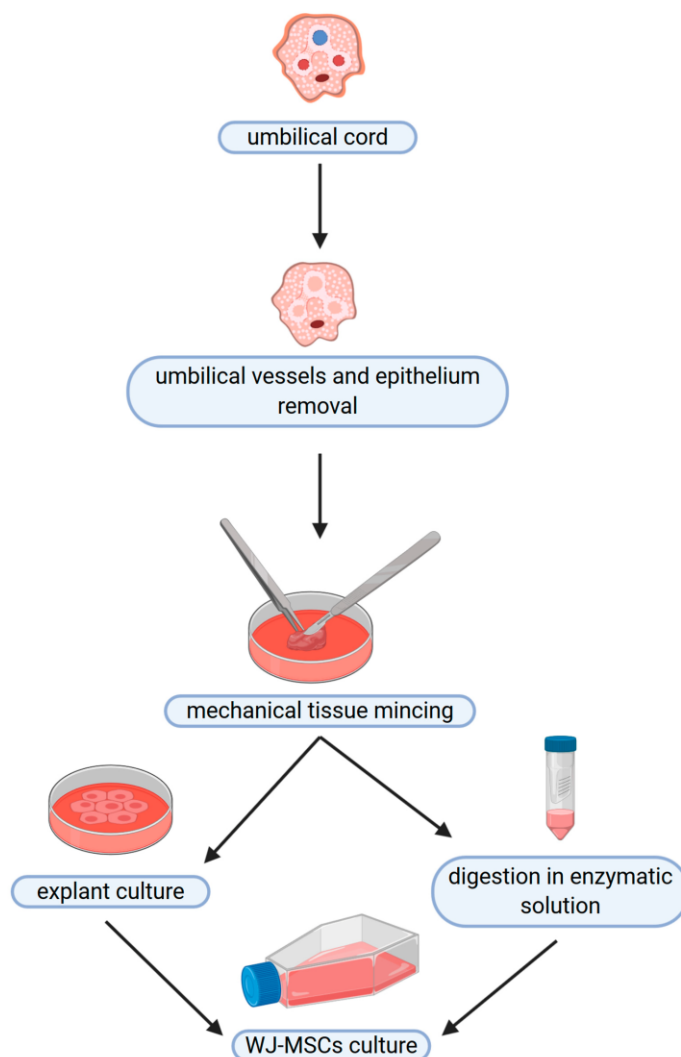
Berdasarkan penelitian Rinendyaputri *et. al.* (2011), Azandeh *et. al.* (2012), dan Varaa *et. al.* (2019), isolasi SPM dari WJ tali pusat dengan metode eksplan dilakukan dengan cara memotong tali pusat menjadi beberapa potongan dengan ukuran 1 cm x 1 cm (Gambar 6). Kemudian diletakkan dalam cawan petri berisi larutan desinfektan *povidone iodine* 10% dan alkohol 70% masing-masing sekitar 3-5 menit. Potongan tali pusat (eksplan) tersebut kemudian dibilas dalam larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dan antibiotik-antimikotik 1%. Setelah itu, letakkan potongan eksplan pada wadah kultur seperti *well-plate* atau cawan petri steril lain. Yang harus diperhatikan dalam metode ini adalah permukaan dalam WJ tali pusat harus menempel pada permukaan wadah kultur. Kemudian medium kultur ditambahkan secukupnya supaya eksplan tidak melayang. Kemudian medium kultur diganti setiap 2-3 hari sekali.²⁰⁻²² Corotchi *et. al.* (2013) juga melaporkan bahwa sebelum isolasi WJ tali pusat, terlebih dahulu matriks dibebaskan dari arteri, vena, dan epitel amnion. Eksplan dipotong dengan ukuran yang lebih kecil yaitu 2 mm^{2, 23}.



Gambar 6. Isolasi SPM dari WJ tali pusat dengan metode eksplan^{21,24}

b. Metode enzimatik

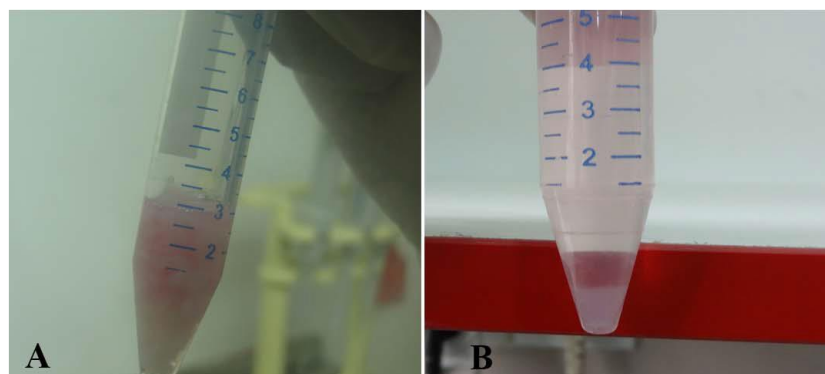
Berdasarkan penelitian Corotchi *et. al.* (2013) dan Chen *et. al* (2016), isolasi SPM dari WJ tali pusat dilakukan dengan mencuci tali pusat (ukuran 4-6 cm) dengan PBS steril dan membuang sisa darah yang ada dalam arteri dan vena, dan matriks dibebaskan dari jaringan yang lain, termasuk dibebaskan dari arteri, vena, dan jaringan epitel dari amnion. Kemudian matriks dipotong sebesar 1 mm³ dan ditambahkan enzim kolagenase dan hyaluronidase kemudian diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C (Gambar 7). Larutan disaring sehingga didapatkan filtrat berupa sel. Filtrat kemudian disentrifugasi 290g selama 10 menit dan supernatan dibuang. Pelet dicuci dengan PBS 2x dan dikultur dalam flask T75 dengan kepadatan sel 1x10⁶/ml dan ditambah medium DMEM/F12 yang ditambah 10% FBS, 100 µ/ml penicillin, 100 µ/ml streptomycin kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah 4-5 hari, sel-sel yang tidak melekat dibuang dan medium diganti setiap 2-3 hari. Setelah sel mencapai konfluen 80%, sel dapat dipasase.^{23,25}



Gambar 7. Isolasi SPM dari WJ tali pusat dengan eksplan dan enzimatik¹³

c. Metode enzimatik-eksplan

Berdasarkan penelitian Azandeh *et.al.* (2012), isolasi SPM dari WJ tali pusat menggunakan metode enzimatik-eksplan dilakukan dengan menggabungkan cara yang dilakukan pada metode eksplan dan enzimatik. Jaringan WJ tali pusat dipotong dan dicacah dengan ukuran 1 cm³, kemudian dicuci dengan PBS. Potongan matriks WJ ditaruh di tabung Falcon 50 mL berisi medium DMEM-LG (*low glucose*) dan enzim yang terdiri dari 4 mg/mL kolagenase tipe I dan 1 mg/mL hyaluronidase, kemudian diinkubasi selama 1 jam. Kemudian ditambah larutan tripsin *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) 0.1% dan diinkubasi dalam inkubator selama 30 menit pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Kemudian potongan WJ dicuci dalam larutan PBS dan dipindahkan ke cawan petri dan prosedur eksplan diulangi (Gambar 8).²¹ Pada metode ini, SPM dari WJ tali pusat dapat diisolasi lebih cepat yaitu hanya 24-48 jam.²²



Gambar 8. Isolasi SPM dari WJ tali pusat dengan metode enzimatik²¹

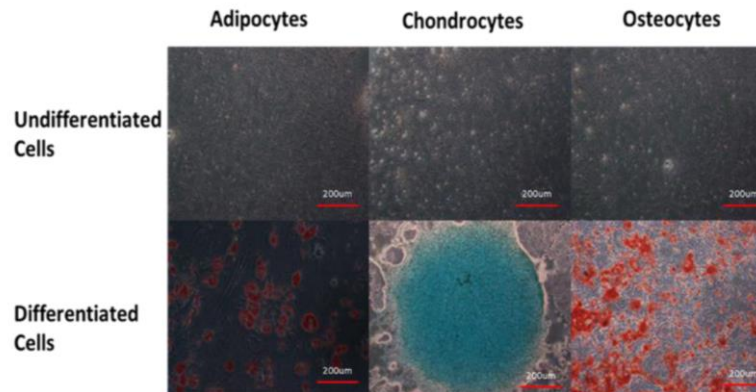
Dari ketiga metode isolasi SPM dari WJ tali pusat, terdapat kelebihan dan kekurangan dari masing-masing metode, yaitu (Tabel 1):

Tabel 1. Perbandingan metode isolasi SPM dari *Wharton Jelly* tali pusat²²

Metode Isolasi	Kelebihan	Kekurangan
Metode eksplan	<ul style="list-style-type: none"> • Tingkat proliferasi tinggi • Jumlah sel homogen lebih tinggi • Dapat mengurangi kontaminasi • Biaya isolasi lebih murah • Tidak terjadi ‘stres proteolitik’ pada sel 	<ul style="list-style-type: none"> • Potongan eksplan dapat mengambang • Waktu yang dibutuhkan dalam isolasi sel lebih lama
Metode enzimatik	<ul style="list-style-type: none"> • Dapat menggunakan beberapa atau semua bagian tali pusat sebagai sumber SPM • Meningkatkan jumlah sel punca lebih cepat • Protokol isolasi membutuhkan waktu 3 jam 	<ul style="list-style-type: none"> • Terjadinya ‘stres proteolitik’ pada sel • Biaya isolasi SPM meningkat • Meningkatkan risiko terjadinya kontaminasi
Metode enzimatik-eksplan	<ul style="list-style-type: none"> • Waktu isolasi lebih singkat • Jumlah sel homogen lebih tinggi • Viability SPM mencapai 90% setelah kriopreservasi 	<ul style="list-style-type: none"> • Terjadi ‘stres proteolitik’ pada sel tetapi lebih rendah dari metode enzimatik • Biaya isolasi meningkat • Meningkatkan risiko kontaminasi

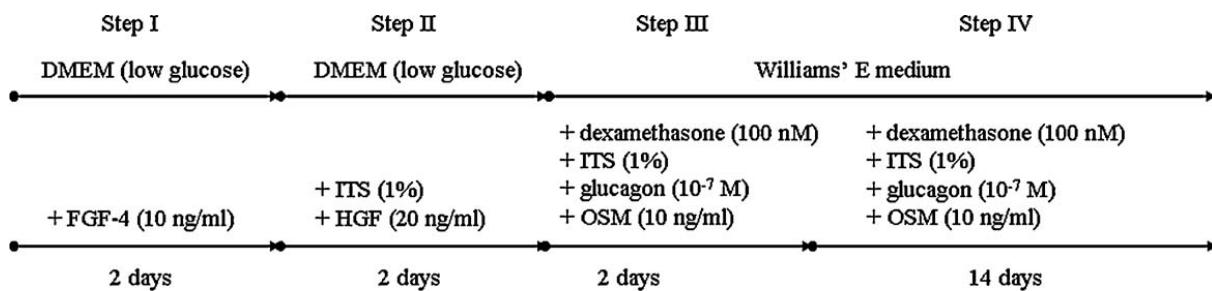
Kemampuan Diferensiasi SPM dari WJ Tali Pusat

SPM disebutkan memiliki sifat multipoten, yaitu SPM dapat berdiferensiasi menjadi sel lain. SPM dari WJ tali pusat manusia dilaporkan dapat berdiferensiasi menjadi osteosit, kondrosit, adiposit, dan hepatosit. Penelitian tentang metode diferensiasi SPM menjadi beberapa sel tersebut telah banyak dilaporkan, yaitu dengan penambahan beberapa faktor penginduksi dan faktor pertumbuhan ke dalam medium kultur secara *in vitro*²⁶. Bahkan saat ini, kit medium diferensiasi juga sudah banyak beredar misalnya *StemPro Osteogenesis Differentiation Kit*, *StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit*, dan *StemPro Adipogenesis Differentiation Medium*. Kemudian hasil diferensiasi dikonfirmasi dengan pewarnaan spesifik untuk setiap jenis sel, misalnya *oil red o* untuk pewarnaan adiposit, *alcian blue* untuk pewarnaan kondrosit, dan *alizarin red* untuk pewarnaan osteosit (Gambar 9).²⁷



Gambar 9. Diferensiasi SPM dari WJ tali pusat menjadi adiposit, kondrosit, dan osteosit²⁷

Selain berdiferensiasi menjadi adiposity, kondrosit, dan osteosit, SPM dari WJ tali pusat juga dilaporkan dapat berdiferensiasi menjadi hepatosit. Penelitian yang dilakukan *Yoon et. al.* (2010) menyebutkan bahwa diferensiasi SPM dari WJ tali pusat dapat dilakukan dengan 4 langkah (Gambar 10). Langkah pertama adalah kultur SPM dengan DMEM-LG yang ditambah 10 ng/mL FGF-4 selama 2 hari. Langkah kedua adalah kultur SPM dengan DMEM-LG yang ditambah dengan 1% insulin-transferin-selenium (ITS) dan 20 ng/mL *hepatocyte growth factor* (HGF) selama 2 hari. Langkah ketiga adalah kultur SPM dengan DMEM-LG yang ditambah dengan 100nM Dexametason, 1% ITS, 100 nM Glucagon, dan 10ng/mL oncostatin M (OSM) selama 2 hari. Langkah keempat adalah SPM dikultur dengan DMEM-LG yang ditambah dengan 100 nM Dexametason, 1% ITS, 100 nM Glucagon, 10 ng/mL OSM, 1% *dimethyl sulfoxide* (DMSO) atau 100 nM trichostatin A (TSA) selama 8 hari. Medium induksi diganti setiap 2 hari. SPM hasil induksi mengekspresikan beberapa penanda hepatosit yaitu CK8, α -fetoprotein (α -FP), albumin, dan α -smooth muscle actin (α -SMA).²⁴



Gambar 10. Metode diferensiasi SPM menjadi hepatosit²⁴

Aplikasi SPM dari WJ Tali Pusat

SPM dari WJ tali pusat dilaporkan dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, adiposit, dan hepatosit. Oleh sebab itu, SPM dari WJ tali pusat berpotensi besar dalam terapi penyakit degeneratif. Berikut beberapa aplikasi SPM dari WJ tali pusat dalam terapi penyakit degeneratif (Tabel 2).

Tabel 2. Aplikasi SPM dari WJ tali pusat pada beberapa penyakit degeneratif

Kondisi	Dosis	Metode transplantasi	Referensi
Kanker	0,5 x 10 ⁶ sel 1,5 x 10 ⁶ sel 3 x 10 ⁶ sel	Injeksi pada subkutan pada area tumor/kanker	Ma <i>et. al.</i> (2012) ²⁸
Miokardial	4 x 10 ⁷ sel	Injeksi pada area iskemik di jantung	Zhang <i>et. al.</i> (2013) ²⁹
Miokardial	2 x 10 ⁵ sel	Injeksi pada intramiokardial	Nascimento <i>et. al.</i> (2014) ³⁰
Penyembuhan luka	1 x 10 ⁶ sel	Injeksi pada kulit	Sabapathy <i>et. al.</i> (2014) ³¹
Spinal cord injury	0,5 atau 1,5 x 10 ⁶ sel	Intratekal	Krupa <i>et. al.</i> (2018) ³²

4. Kesimpulan

SPM yang diisolasi dari WJ tali pusat manusia dapat diisolasi dengan metode eksplan, metode enzimatik, dan metode enzimatik-eksplan yang dapat mengekspresikan beberapa penanda spesifik. SPM dari WJ tali pusat manusia mampu berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, dan adiposit. Oleh sebab itu, SPM berpotensi besar dalam terapi penyakit degeneratif.

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. Sun Q, Zhang Z, Sun Z. The potential and challenges of using stem cells for cardiovascular repair and regeneration. *Genes Dis.* 2014;1(1):113-119. doi:10.1016/j.gendis.2014.07.003
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. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells.* 2019;37(7):855-864. doi:10.1002/STEM.3016
4. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35:191. doi:10.1042/BSR20150025
5. Zolfaghar M, Mirzaeian L, Beiki B, et al. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells differentiate into oocyte like cells in vitro by follicular fluid and cumulus cells conditioned medium. *Heliyon.* 2020;6(10):1-11. doi:10.1016/J.HELIYON.2020.E04992
6. Kaveh K, Ibrahim R, Abu Bakar MZ, Ibrahim T 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
7. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(68):1-22. doi:10.1186/s13287-019-1165-5
8. Rantam F. *Stem Cell Exploration Method of Isolation and Culture. 1st Edition.* Airlangga University Press; 2009.
9. Balogh P, Engelmann P. *Transdifferentiation and Regenerative Medicine.* (Balogh P, Peter E, Bogнар R, eds.). University of Pecs; 2011. http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Transzdifferentiation_en_book/ch01s06.html
10. Bhonde RR, Sheshadri P, Sharma S, Kumar A. Making surrogate β -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
11. 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.
12. Van Pham P, Truong NC, Le PTB, et al. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(2):289-302. doi:10.1007/s10561-015-9541-6
13. Stefańska K, Ożegowska K, Hutchings G, et al. Human Wharton's Jelly—cellular specificity, stemness potency, animal models, and current application in human clinical trials. *J Clin Med.* 2020;9:1-22. doi:10.3390/jcm9041102
14. Laverdet B, Micallef L, Lebreton C, et al. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol Biol.* 2014;62(2):108-117. doi:10.1016/j.patbio.2014.01.002
15. Moreira A, Kahlenberg S, Hornsby P. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2017;59(3):R109-R120. doi:10.1530/JME-17-0117

16. Habibollah S, Forraz N, McGuckin C. Application of Umbilical Cord and Cord Blood as Alternative Modes for Liver Therapy. In: Bhattacharya N, Stubblefield PG, eds. *Regenerative Medicine: Using Non-Fetal Sources of Stem Cells*. Springer-Verlag; 2015:1-285. doi:10.1007/978-1-4471-6542-2
17. 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
18. 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
19. 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
20. Rinendyaputri R, Dani F, Polim A, Boediono A. Vitrification Method Efficacy of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Derived from Wharton's Jelly. *J Biotek Medisiana Indones*. 2011;6(1):9-19. Accessed February 10, 2022. <https://ejournal2.litbang.kemkes.go.id/index.php/jbmi/article/view/1681/884>
21. Azandeh S, Orazizadeh M, Hashemitabar M, et al. Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. *J Biomed Sci Eng*. 2012;5:580-586. doi:10.4236/jbise.2012.510071
22. Varaa N, Azandeh S, Khodabandeh Z, Gharravi AM. Wharton's Jelly mesenchymal stem cell: Various protocols for isolation and differentiation of hepatocyte-like cells; narrative review. *Iran J Med Sci*. 2019;44(6):437-448. doi:10.30476/ijms.2019.44952
23. Corotchi MC, Popa MA, Remes A, Sima LE, Gussi I, Lupu Plesu M. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(81):1-16. doi:10.1186/scrt232
24. Yoon HH, Jung BY, Seo YK, Song KY, Park JK. In vitro hepatic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell. *Process Biochem*. 2010;45:1857-1864. doi:10.1016/j.procbio.2010.06.009
25. Chen Z, Kuang Q, Lao X-J, Yang J, Huang W, Zhou D. Differentiation of UC-MSCs into hepatocyte-like cells in partially hepatectomized model rats. *Exp Ther Med*. 2016;12:1775-1779. Accessed February 24, 2022. <https://pdfs.semanticscholar.org/1aa8/f379db6e5692bd200759c5a0f36bd0d820bf.pdf>
26. Taran R, Mamidi MK, Singh G, et al. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci*. 2014;39:157-169.
27. Rizal R, Syaidah R, Evelyn E, Hafizh AM, Frederich J. Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells: Differentiation Capacity Showing its Role in Bone Tissue Engineering. *Int J Technol*. 2020;11(5):1005-1014. doi:10.14716/ijtech.v11i5.4309
28. Ma Y, Hao X, Zhang S, Zhang J. The in vitro and in vivo effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133:473-485. doi:10.1007/s10549-011-1774-x
29. Zhang W, Liu XC, Yang L, et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis*. 2013;24(7):549-558. doi:10.1097/MCA.0b013e3283640f00
30. Nascimento DS, Mosqueira D, Sousa LM, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(5):1-14. doi:10.1186/scrt394
31. Sabapathy V, Sundaram B, Vm S, Mankuzhy P, Kumar S. Human wharton's jelly mesenchymal stem cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS One*. 2014;9(4):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0093726
32. Krupa P, Vackova I, Ruzicka J, et al. The effect of human mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly in spinal cord injury treatment is dose-dependent and can be facilitated by repeated application. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1-18. doi:10.3390/ijms19051503

33. Chudickova M, Vackova I, Urdzikova LM, et al. The effect of wharton jelly-derived mesenchymal stromal cells and their conditioned media in the treatment of a rat spinal cord injury. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1-19. doi:10.3390/ijms20184516