

# **Studi Literatur : Teknik Kultur Dalam Teknologi Biomanufaktur *Pluripotent Stem Cells In Vitro***

**Raden Rara Dinda Larasati<sup>1</sup>, Wahyuni Wulansari<sup>1</sup>, Nosa Septiana Anindita<sup>1</sup>,  
Annisa Khumaira<sup>1</sup>, dan Fuad Gandhi Torizal<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi, fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah  
Yogyakarta

## **Abstrak**

*Pluripotent stem cells* (PSCs) merupakan jenis sel yang belum memiliki fungsi spesifik dan mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel penyusun tubuh manusia. Keunggulan PSCs telah memberikan perhatian besar dalam dunia penelitian dan aplikasi bidang kesehatan. Umumnya, penelitian dan aplikasi PSCs membutuhkan jumlah sel yang banyak.. Teknik kultur *adherent* dan suspensi sebagai teknologi biomanufaktur PSCs secara *in vitro* merupakan dua faktor utama yang mempengaruhi kualitas dan jumlah perbanyakan PSCs. Teknik kultur dalam produksi kultur PSCs dapat dioptimalkan dengan penggunaan sistem bioreaktor. Keberhasilan teknologi biomanufaktur PSCs juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti media pertumbuhan, matriks ekstraseluler, Oksigen, pH dan *shear stress*.

Kata kunci: *Pluripotent stem cells*, teknik kultur, lingkungan kultur, bioreaktor

## **Abstract**

Pluripotent stem cells (PSCs) are types of cells that do not yet have specific functions and are able to differentiate into various types of cells that make up the human body. The excellence of PSCs has given great attention to the research and applications in the health sector. Generally, the research and application of PSCs requires a large number of cells. Adherent and suspension culture techniques as biomanufacture technology of PSCs *in vitro* are the two main factors affecting the quality and number of PSCs propagation. Culture techniques in the production of PSCs culture can be optimised by using a bioreactor system. The success of the PSCs' biomanufacture technology is also influenced by environmental factors such as growth media, extracellular matrix, oxygen, pH and shear stress.

Key words: Pluripotent stem cells, culture techniques, culture environment, bioreactors

## PENDAHULUAN

Saat ini upaya pengobatan penyakit degeneratif atau yang berhubungan dengan kerusakan sel, jaringan maupun organ yang bersifat *irreversible* telah banyak dilakukan dengan berbagai macam cara yang potensial, salah satunya ialah melalui sel punca atau yang disebut sebagai *stem cells*. *Stem cells* kini telah dikembangkan dan digunakan oleh beberapa negara dalam bidang terapeutik. Indonesia merupakan salah satu negara yang sudah mulai mengembangkan dan menggunakan *stem cells*.

*Stem cells* merupakan sel yang memiliki kemampuan untuk memperbanyak diri dalam jangka waktu lama, belum memiliki fungsi yang spesifik dan mampu berdiferensiasi dalam menjadi tipe sel tertentu yang membangun jaringan dan organ dalam tubuh (Fernandes *et al.*, 2013). Berdasarkan sumbernya *stem cell* dibagi menjadi dua jenis, yaitu *embryonic stem cells* (ESCs) dan *adult stem cells* (ASCs). Selanjutnya, berdasarkan potensi untuk berdiferensiasi, *stem cell* dikelompokkan menjadi 4 jenis, yaitu *unipotent stem cell*, *totipotent stem cells*, *multipotent stem cells* dan *pluripotent stem cells* (Larijani *et al.*, 2012). *Pluripotent stem cells* (PSCs) merupakan jenis *stem cell* yang potensial untuk aplikasi kesehatan manusia karena PSCs memiliki kemampuan utama yang berbeda dengan jenis *stem cells* lainnya yaitu memiliki kemampuan berproliferasi yang tidak terbatas dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel penyusun tubuh manusia (Villa-Diaz *et al.* 2013). PSCs disebut sebagai teknologi *stem cells* untuk upaya pengobatan penyakit yang berhubungan dengan kerusakan sel, jaringan maupun organ. Potensi PSCs kini telah memberikan perhatian besar dalam dunia penelitian dan aplikasi bidang kesehatan. Beberapa aplikasi PSCs diantaranya ialah transplantasi sel, pengembangan obat, uji toksikologi, *diseases modelling* dan studi organogenesis. Adapun potensi dan keunggulan yang dimiliki oleh PSCs juga tidak lepas dari berbagai tantangan didalamnya. Salah satu tantangan tersebut diantaranya ialah diperlukannya jumlah PSCs yang banyak untuk keperluan penelitian dan aplikasi teknologi PSCs.

Berdasarkan penelitian, jumlah sel yang dibutuhkan untuk aplikasi *stem cell* pada satu pasien ialah berkisar 10 sampai 100 juta *stem cell* (Madl *et al.*, 2018). Sementara itu, proses produksi PSCs memerlukan waktu yang lama untuk mendapatkan kualitas PSCs yang baik. (Simonson *et al.*, 2015). Adapun salah satu faktor utama untuk memproduksi PSCs dalam jumlah yang dibutuhkan dengan kualitas baik ialah terletak pada kultur sel pada *stem cells* yang sudah diisolasi. Kultur *stem cells* yang diperoleh dalam skala besar pada umumnya dapat dilakukan melalui teknologi biomanufaktur kultur *stem cells*. Kultur *stem cells* dalam teknologi biomanufaktur kultur *stem cells* pada dasarnya terdiri atas dua teknik, yaitu teknik *adherent* dan suspensi. Adapun kendala yang terdapat pada kultur *stem cells* ialah terletak pada teknik kultur. Hal tersebut terjadi karena minimnya protokol kultur terstandar untuk memperoleh jumlah sel yang banyak. Dengan demikian, berdasarkan potensi aplikasi PSCs dan kebutuhan jumlah *stem cells* untuk perkembangan riset maupun aplikasi *stem cells* di Indonesia, maka informasi terkait teknik kultur yang baik dan ideal perlu diperoleh. Hal ini mendasari dilakukannya studi literatur terkait kultur *adherent* dan suspensi serta kondisi lingkungan yang mempengaruhi sebagai teknologi biomanufaktur PSCs *in vitro*.

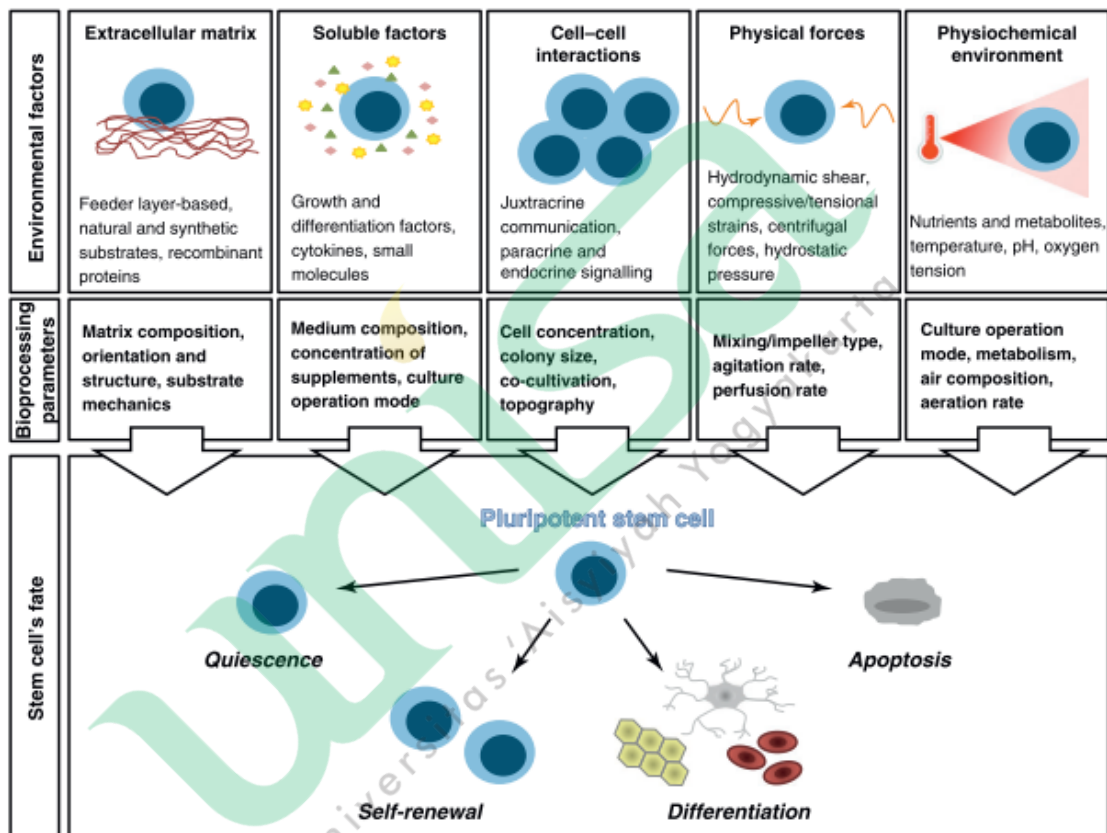
## METODE PENELITIAN

Literatur ini dilakukan dengan melakukan studi literatur sistem kultur *adherent* dan suspensi sebagai teknologi biomanufaktur PSCs *in vitro* yang

difokuskan terhadap metode dan kondisi lingkungan perbanyakan PSCs melalui sistem kultur *adherent* dan suspensi serta evaluasi keberhasilannya. Literatur ini dilakukan melalui studi literatur yang berasal jurnal ilmiah yang dipublikasi dalam rentang waktu 20 tahun 2000 hingga tahun 2020.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan teknologi biomanufaktur PSCs dipengaruhi oleh lingkungan kultur sel dan teknik kultur sel. Lingkungan kultur sel dalam perbanyakan sel umumnya mampu mendukung sel untuk mempertahankan sifat pluripotensinya dan tidak terjadi diferensiasi spontan dalam proses kultur. Keberhasilan kultur sel dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Faktor yang mempengaruhi kondisi sel dalam biomanufaktur PSCs

(Sumber: Serra *et al.*, 2012)

Faktor yang mempengaruhi kondisi sel dalam biomanufaktur PSCs dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan dan penggunaan berbagai teknik kultur PSCs. Beberapa informasi yang dapat dijadikan sebagai pertimbangan untuk keberhasilan kultur PSCs dalam studi literatur ini dijelaskan dalam bentuk komponen utama kultur, lingkungan artifisial dan biomanufaktur kultur *stem cells*.

### A. Komponen utama Kultur *Pluripotent Stem Cells*

Komponen utama kultur *pluripotent stem cells* (PSCs) merupakan faktor yang mempengaruhi kualitas, ketahanan dan penggunaan berbagai metode kultur PSCs. Hal tersebut membuat komponen utama kultur PSCs dapat digunakan untuk merumuskan protokol kultur PSCs. Komponen utama kultur PSCs tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut:

## 1. Media pertumbuhan

Media pertumbuhan adalah salah satu komponen utama yang mempengaruhi keberhasilan perbanyakan kultur *in vitro* dan diferensiasi (Shen *et al.*, 2012). Kultur sel memiliki faktor utama yaitu penggunaan serum dan penggunaan produk hewan pada media pertumbuhan (Usta *et al.*, 2014). Namun demikian, penggunaan media pertumbuhan PSCs pada dasarnya telah mengalami evolusi dinamis sejak pertama kali digunakan untuk kultur ESCs manusia (Thomson *et al.*, 1998 *Cit* Chen *et al.*, 2014).

Penggunaan media pertumbuhan pada kultur PSCs konvensional pada umumnya berisi sumber nutrisi pertumbuhan yang berasal dari serum fetal sapi dan faktor pertumbuhan lainnya yang diturunkan dari hewan (Dakhore *et al.*, 2018). Penggunaan media yang bersumber makhluk hidup dan bukan manusia atau yang disebut sebagai media xenogenik dapat berpotensi infeksi organisme patogen dan mendatangkan resiko penolakan imun pada manusia (Manello dan Tonti., 2007). Hal tersebut membuat para ilmuwan dalam beberapa tahun terakhir berusaha untuk mengeliminasi penggunaan media yang berasal dari hewan. Adapun teknik kultur sel tanpa menggunakan materi yang berasal dari hewan disebut dengan *xenofree* (Pei *et al.*, 2017; Piza *et al.*, 2009).

Upaya penggunaan media berbasis *xenofree* dimulai dengan penggunaan serum yang berasal dari manusia. Penggunaan medium berbasis serum manusia tersebut dapat mempertahankan sifat pluripotensi dan pembaruan diri pada kultur sel (Ellerstrom *et al.*, 2006). Namun, serum manusia tersebut juga memiliki kekurangan salah satunya terdapat variabilitas kultur PSCs yang berhubungan dengan kemampuannya untuk mempertahankan sifat pluripotensi, pembaharuan diri, potensi diferensial dan kariotipe yang stabil (Dakhore *et al.*, 2018). Kekurangan penggunaan serum manusia maupun hewan membuat penggunaan medium pertumbuhan seperti medium tanpa serum (*serumfree*) dan medium yang berasal dari hewan (*xenofree*) perlu dikembangkan (Chen *et al.*, 2014).

Media pertumbuhan berbasis *serumfree* dan *xenofree* merupakan media pertumbuhan yang mulai dikembangkan untuk mendukung pertumbuhan PSCs. Beberapa media pertumbuhan yang dikembangkan di antaranya ialah Activin, Nodal, FGF dan Media E8 (Chen *et al.*, 2014). Activin, nodal, TGF $\beta$ 1, FGF disebut sebagai faktor pertumbuhan pada media yang mampu memelihara sifat pluripotensi dan pembaruan diri pada sel kultur PSCs (Vallier *et al.*, 2005; Pauklin dan Vallier, 2015). Sementara itu, Media E8 adalah media yang dikembangkan untuk mempertahankan sifat pluripotensi PSCs dengan delapan komponen penting (Chen *et al.*, 2011). Komponen tersebut terdiri dari faktor pertumbuhan (insulin, FGF dan TGF $\beta$ ), nutrisi dasar (DMEM/F12), antioksidan (selenium, vitamin C, dan transferrin) serta modulator pH (NAHCO $_3$ ) (Liu *et al.* 2019; Chen *et al.*, 2011).

Komponen penting lain pada umumnya juga terdapat pada media pertumbuhan PSCs, beberapa diantaranya ialah antibiotik, antijamur, antioksidan, asam amino, karbohidrat, transferrin dan insulin. Menurut Halim *et al.* (2013) Antibiotik dan antijamur seringkali digunakan ke dalam media pertumbuhan untuk menghindari kontaminasi organisme seperti bakteri dan jamur yang dapat mengganggu pertumbuhan dan organisme yang bersifat patogen jika diperuntukan untuk terapi. Sementara itu, Ikeda *et al.* (2016) dan Shaban *et al.* (2017) melaporkan bahwa penggunaan antioksidan dalam

media pertumbuhan bertujuan untuk mengurangi stress oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup *stem cells*. Adapun efek menguntungkan lebih lanjut dari penggunaan antioksidan menurut Ji *et al.* (2014) dan Shaban *et al.* (2017) ialah stabilitas genom dan kemampuan adhesi *stem cells* pada media kultur menjadi lebih baik.

Asam amino adalah komponen protein yang merupakan sumber energi untuk semua sel (Shen *et al.*, 2012). Asam amino dalam media pertumbuhan PSCs memiliki peran, yaitu antara lain memberikan nutrisi pada sel sehingga dapat memberikan pengaruh yang kuat terhadap pertumbuhan sel, pembaruan sel (Killberg *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019) serta mampu mempengaruhi mekanisme epigenetic pada PSCs yang dikenal sebagai langkah penting dalam diferensiasi (Killberg *et al.*, 2016). Selanjutnya, karbohidrat juga merupakan komponen yang berperan untuk metabolisme sel kultur PSCs yang kemudian dapat mempertahankan karakteristik sel dan mengoptimalkan kondisi kultur (Spyrou *et al.*, 2019)

Transferrin merupakan suatu glikoprotein yang diperlukan dalam media pertumbuhan sel dan memberikan fungsi pada sel untuk mengambil oksigen serta merangsang aktivitas enzim yang berhubungan dengan pertumbuhan sel. Adapun jenis transferrin yang biasa ditambahkan ke dalam media pertumbuhan ialah *holo-transferrin* dan *apo-transferrin* (Nakasima dan Omasa, 2016). Sementara itu, insulin merupakan salah satu hormon yang diperlukan untuk media pertumbuhan berbasis *serumfree* yang bersinergi dengan faktor pertumbuhan lainnya seperti FGF untuk merangsang proliferasi sel dalam media kultur (Straus, 1984 Cit Shen *et al.*, 2012).

## 2. Matriks ekstraseluler

Matriks ekstraseluler merupakan komponen fungsional utama dalam bentuk kompleks molekul tiga dimensi yang bertanggung jawab untuk mentransmisikan sinyal lingkungan ke sel yang pada akhirnya akan mempengaruhi kelangsungan hidup, pemeliharaan, proliferasi dan diferensiasi *stem cells* (Votteler *et al.*, 2010). Matriks ekstraseluler disebut sebagai protein adhesi eksogen yang memiliki peran untuk mempertahankan pluripotensi PSCs dan menghindari adanya kematian sel atau diferensiasi sel. Adapun *mouse fibroblast feeder cells* (MEFs), *matrigel*, *fibronectin*, *vitronectin*, *synthetic peptides*, laminin dan *inter  $\alpha$ -inhibitor* merupakan beberapa jenis yang dianggap sebagai matriks ekstraseluler PSCs (Liu *et al.*, 2019).

## B. Lingkungan artifisial *Pluripotent Stem Cells*

Lingkungan artifisial PSCs merupakan faktor pendorong pertumbuhan PSCs. Lingkungan artifisial meliputi beberapa faktor yang akan memberikan pengaruh pada pluripotensi sel dan diferensiasi PSCs. Beberapa faktor tersebut antara lain:

### 1. Oksigen (O<sub>2</sub>)

O<sub>2</sub> merupakan salah satu komponen terpenting dalam dalam kultur sel (Levenberg *et al.*, 2014) dan terlibat dalam hampir semua siklus metabolisme sel (Kurniati, 2020). Kondisi O<sub>2</sub> PSCs pada umumnya biasa dioperasikan dalam standar inkubator, yaitu 20% (Serra *et al.*, 2012). Namun demikian, beberapa studi menunjukkan bahwa kondisi hipoksia (2-6% O<sub>2</sub>) dalam kultur



PSCs dapat mendukung pluripotensi sel (Serra *et al.*, 2010 *Cit* Serra *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 2009) dan mempertahankan integritas kariotipe sel (Forsyth *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2009).

## 2. pH

pH merupakan derajat keasaman yang menjadi salah satu parameter penting dalam kehidupan dan kultur PSCs. Variasi pH mempengaruhi setiap proses biologis pada seluruh tubuh, sehingga pH juga memiliki peran dalam mempengaruhi sifat sel (Kim *et al.*, 2016). Umumnya, pH yang diperlukan pada kultur PSCs ialah pH 7,4 (Serra *et al.*, 2012). Namun demikian, perubahan pH dapat terjadi dan dipengaruhi oleh akumulasi laktat sebagai produk metabolit buangan yang dapat berubah menjadi asam laktat di dalam media (Horiguchi *et al.*, 2018).

Beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa pH asam akibat akumulasi asam laktat akan mengganggu pluripotensi dan menurunkan viabilitas sel (Horiguchi *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2017). Adapun ambang batas akumulasi laktat maksimum yang dapat ditoleransi oleh PSCs dalam media kultur adalah 1.5 g/L untuk kultur suspensi (Ouyang *et al.*, 2007) dan 1 g/L untuk kultur adherent. Selanjutnya, untuk menjaga, media PSCs diperlukannya pergantian media secara berkala (Horiguchi *et al.*, 2018).

## 3. *Shear stress*

*Shear stress* merupakan faktor biomekanik yang sangat penting dalam suatu kultur sel yang dapat mempengaruhi kondisi fisiologis atau gen pada sel (Friedly *et al.*, 2012). Umumnya *shear stress* terjadi ketika agitasi dalam kondisi hidrodinamik dilakukan secara berlebihan sehingga dapat menurunkan viabilitas dan pluripotensi sel (Abbasalizadeh *et al.*, 2012). Sementara itu, agitasi merupakan upaya pengadukan pada kultur sel agar tidak terbentuk ukuran agregat yang besar (Kehoe *et al.*, 2010) dan dapat meningkatkan transfer nutrisi dan oksigen pada sel serta lingkungan kultur menjadi tetap homogen (Kinney *et al.*, 2011).

## C. Biomanufaktur *Pluripotent Stem Cells*

Teknologi biomanufaktur PSCs pada umumnya didasari atas dua teknik kultur, yaitu teknik kultur *adherent* dan teknik kultur suspensi. Namun demikian, teknik kultur *adherent* juga dapat diadaptasikan ke dalam teknik kultur suspensi (Kempf *et al.*, 2015). Masing-masing penggunaan dari teknik tersebut ialah sebagai berikut:

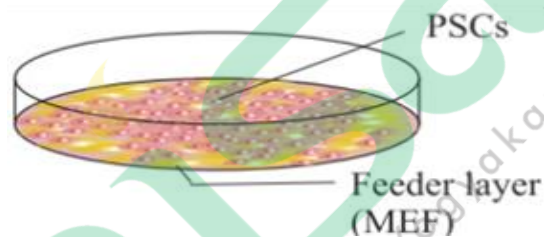
### 1. Teknik kultur *adherent*

Teknik kultur adherent merupakan teknik kultur yang secara tradisional *stem cells* diperbanyak sebagai kultur monolayer dalam dua dimensi (2D) diatas *culture plate*, kaca atau *flask* (McKee dan Chaudhry, 2017; Edmonson *et al.*, 2014). Umumnya, perbanyakkan sel PSCs dipertahankan dalam kondisi 2D dengan sel-sel yang menempel kultur atau matriks yang menutupi permukaan pelat kultur (Kropp *et al.*, 2017).

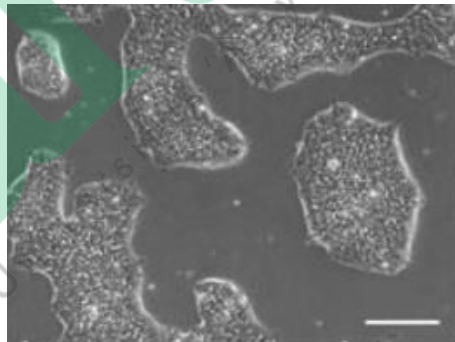
Keunggulan kondisi 2D pada kultur PSCs membuat pemeriksaan morfologi koloni PSCs dapat mudah diamati dengan visualisasi langsung menggunakan mikroskop, sehingga kondisi kultur PSCs dapat lebih mudah dilakukan pemantauan serta mudah untuk pergantian media (Le dan

Hasegawa, 2019). Kultur *adherent* biasanya relatif sederhana dan murah (Edmonson *et al.*, 2014). Namun demikian, penggunaan teknik kultur *adherent* untuk skala besar memiliki banyak kelemahan, salah satu ialah memiliki luas permukaan yang terbatas (Taiani *et al.*, 2013).

Luas permukaan kultur *adherent* umumnya yaitu sekitar 25-225cm<sup>2</sup> (Panchalingam *et al.*, 2015). Penggunaan teknik ini dalam 2-3 hari umumnya dapat memproduksi sel kira-kira  $10 \times 10^6$  pada luas permukaan 75 cm<sup>2</sup> dengan volume 20 mL. Hal tersebut menandakan bahwa penggunaan teknik ini membutuhkan kurang lebih seribu *flask* dengan ukuran 75 cm<sup>2</sup> untuk memperoleh sel  $1 \times 10^{10}$  untuk kebutuhan aplikasi *stem cells* (Taiani *et al.*, 2013). Selanjutnya, kelemahan lainnya ialah teknik kultur *adherent* memiliki kondisi statis yang dapat menyebabkan homogenitas media kurang baik sehingga dapat menyebabkan gradien pada kultur PSCs. Hal ini diperkuat oleh Santos *et al.* (2013) yang menyebutkan bahwa kultur *adherent* sebagai kultur statis dapat menginduksi pembentukan gradien kultur yang tidak diinginkan, sehingga berdasarkan hal tersebut membuat kontrol kultur seperti suhu, pH dan oksigen sulit untuk dilakukan. Adapun Teknik kultur *adherent* PSCs dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Teknik kultur *adherent*  
(Sumber: Torizal *et al.*, 2019)



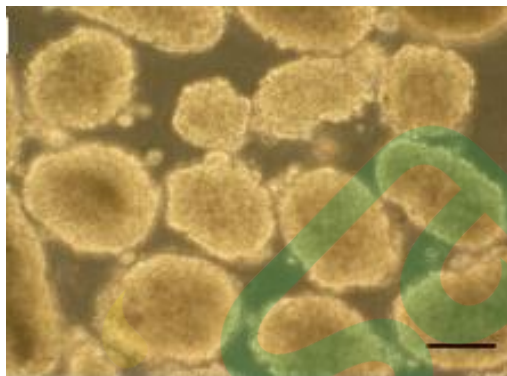
Gambar 8. Morfologi iPSCs dalam kultur *adherent*  
(Sumber: Kwok *et al.*, 2018)

## 2. Teknik kultur suspensi

Teknik kultur suspensi merupakan teknik kultur yang melibatkan pertumbuhan dan proliferasi sel dalam keadaan mengapung pada suatu medium dan membentuk lingkungan 3D. Lingkungan 3D pada kultur suspensi umumnya memberikan kondisi yang serupa seperti pada kondisi *in vivo* yang mampu memberikan kesempatan pada sel untuk berinteraksi dan berkomunikasi dengan sel lainnya. Hal tersebut membuat antar sel saling berbagi faktor pertumbuhan (Keller *et al.*, 2014). Berdasarkan teknisnya, teknik kultur suspensi akan menumbuhkan sel dalam bentuk gumpalan PSCs

bebas matriks sebagai agregat atau sebagai PSCs yang dimobilisasi oleh *microcarrier* ataupun mikroenkapsulasi PSCs (Dakhore *et al.*, 2018).

Lingkungan 3D pada kultur suspensi umumnya diperlukan agitasi untuk memastikan semua sel berada dalam keadaan homogen dan agregasi sel tetap tersuspensi dengan baik (Giobbe *et al.*, 2012). Selanjutnya, beberapa penelitian menyebutkan bahwa agregasi sel yang baik merupakan suatu faktor yang mendukung terbentuknya interaksi sel (Nath *et al.*, 2017). Namun demikian, penggunaan teknik kultur memerlukan agitasi dapat memberikan suatu kelemahan, yaitu terjadinya *shear stress* yang dapat mengakibatkan kematian sel yang tidak terduga (Wang *et al.*, 2005). Adapun salah satu contoh morfologi PSCs tersebut dalam kultur suspensi dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Morfologi ESCs dalam kultur suspensi  
(Sumber: Amit *et al.*, 2010)

Sistem kultur suspensi dalam penggunaannya memiliki berbagai jenis sistem bioreaktor. Bioreaktor merupakan suatu kunci utama dalam sistem kultur suspensi sebagai biomanufaktur. Dengan demikian, biomanufaktur memiliki peran, yaitu memproduksi sel dalam skala besar (Merten, 2015; Wang *et al.*, 2005). Adapun beberapa jenis sistem bioreaktor dalam kultur suspensi ialah *stirred tank bioreactor*, *rotating wall bioreactor*, *wave bioreactor*, *rotating erlenmeyer flask* dan *hollow fiber bioreactor*.

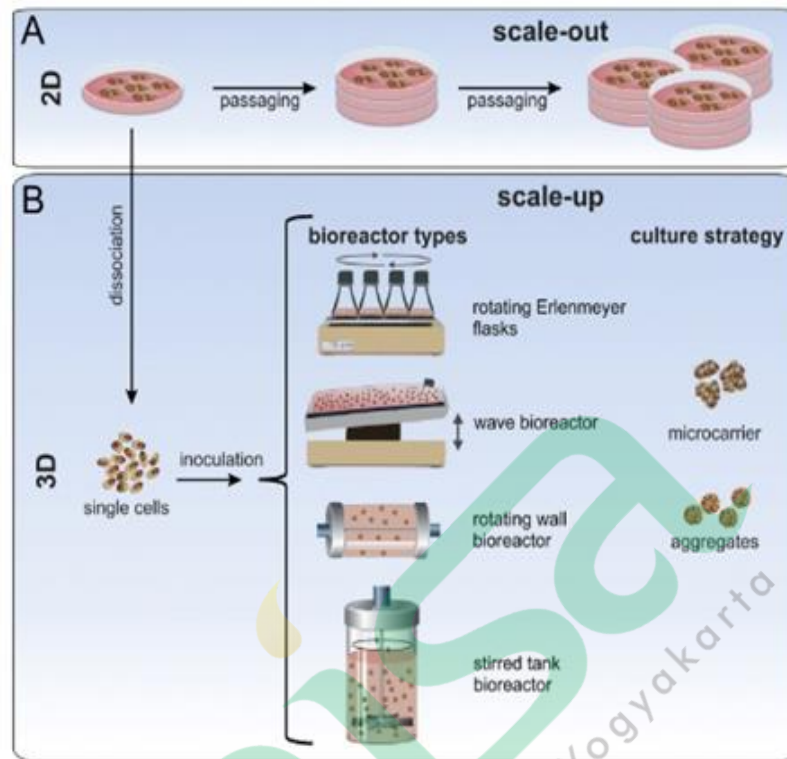
### 3. Kultur *adherent* yang diadaptasi ke kultur suspensi

Kultur sel memungkinkan adanya jenis kultur *two-in-one system* (Le dan Hasegawa., 2019). Jenis kultur tersebut merupakan jenis kultur yang mengadaptasikan kultur *adherent* dalam bentuk kultur suspensi (Torizal *et al.*, 2019). Teknik kultur sel tersebut memfasilitasi transisi PSCs dari kultur 2D statis ke kultur 3D dinamis (Serra *et al.*, 2012). Berdasarkan strategi teknisnya, sistem ini mengandalkan teknik “*scale out*” dan “*scale up*”. Teknik “*scale out*” berfungsi untuk menyediakan lebih banyak permukaan pertumbuhan dalam sistem kultur *adherent*. Sementara itu, teknik “*scale up*” berfungsi untuk peningkatan sel dengan densitas yang tinggi (Le dan Hasegawa., 2019).

Secara teknis, beberapa pendukung sel seperti *microcarrier* dan mikroenkapsulasi dibutuhkan untuk membantu sel dapat beradaptasi dalam kultur suspensi. Pendukung sel pada dasarnya berfungsi untuk memberikan kesempatan pada sel untuk menyesuaikan area yang tersedia pada permukaan pendukung sel tersebut (Serra *et al.*, 2012; Edmondsson *et al.*, 2014) dan



memperluas permukaan kultur (Singh *et al.*, 2010). Dengan demikian, penggunaan teknik kultur *adherent* yang diadaptasikan dalam bentuk kultur suspensi dapat mencapai kepadatan tinggi hingga lebih dari  $10^7$  cells/mL (Wang *et al.*, 2005). Adapun teknik tersebut dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Kultur *adherent* yang diadaptasikan ke kultur suspensi (Sumber: Kropp *et al.*, 2017)

#### D. Aplikasi sistem kultur

Sistem kultur PSCs terdiri beberapa jenis sistem kultur. Adapun perbandingan dan berbagai aplikasi sistem kultur sebagai biomanufaktur PSCs ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan dan berbagai aplikasi sistem kultur

Sistem kultur	Sistem perbanyakan	Sistem kontrol	Sistem pemanenan	Interaksi antar sel	Referensi aplikasi kultur PSCs
Kultur statis konvensional	Kurang baik	Kurang baik	Baik	Kurang baik	hiPSCs (Zwegeirtdt, 2009; Abraham <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2013), ESCs (Abraham <i>et al.</i> , 2010), miPSCs (Yue <i>et al.</i> , 2012), mESC (Tamm <i>et al.</i> , 2013))
<i>Stirred tank bioreactor</i>	Baik	Baik	Baik	Baik	iPSCs (Olmer <i>et al.</i> , 2012; Kwok <i>et al.</i> , 2018; Abbasalizadeh <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2013; Chen dan Couture, 2015; Abecasis <i>et al.</i> , 2017), hESC (Olmer <i>et al.</i> , 2012; Abbasalizadeh <i>et al.</i> , 2012; Krawetz <i>et al.</i> , 2010), miPSCs (Shafa <i>et al.</i> , 2011)
<i>Rotating wall bioreactor</i>	Baik	Baik	Baik	Baik	hESC (Come <i>et al.</i> , 2008), mESC (Hwang <i>et al.</i> , 2009)
<i>Wave bioreactor</i>	Baik	Baik	Baik	Baik	hESC (Otjusi <i>et al.</i> , 2014), hiPSC (Otjusi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Rotating Erlenmeyer flask bioreactor</i>	Baik	Baik	Baik	Baik	hESC (Sahabian <i>et al.</i> , 2019), hiPSC (Sahabian <i>et al.</i> , 2019)
<i>Hollow fiber bioreactor</i>	Baik	Kurang baik	Kurang baik	Baik	hESC (Roberts <i>et al.</i> , 2012), mESC (Knospel <i>et al.</i> , 2016).
<i>Microcarrier Mikroenkapsulasi</i>	Baik Baik	Kurang baik Kurang baik	Kurang baik Kurang baik	Baik Baik	mESC (Fernandes <i>et al.</i> , 2007), hiPSC (Badenes <i>et al.</i> , 2015) hESC (Siti-ismail <i>et al.</i> , 2008; Chayosumrit <i>et al.</i> , 2010), mESC (Wilson <i>et al.</i> , 2013), miPSC (Horiguchi <i>et al.</i> , 2014; Horiguchi dan Sakai, 2015)

#### Keterangan:

- mESC dan miPSC merupakan PSCs yang diperoleh dari tikus
- hESC dan hiPPSCs merupakan PSCs yang diperoleh dari manusia

Berdasarkan perbandingan dari beberapa kultur PSCs, sistem kultur bioreaktor merupakan teknik perbanyakan sel yang paling baik dibandingkan dengan sistem kultur konvensional sebagai kultur monolayer yaitu ditinjau dari jumlah sel kultur, lingkungan kultur dan interaksi sel. Sistem kultur statis konvensional secara umum dikenal sebagai kultur *adherent* yang memiliki luas permukaan pertumbuhan sel yang terbatas. Dengan demikian, hal tersebut membuat sistem kultur statis konvensional memiliki sistem kultur perbanyakan yang kurang baik jika dibandingkan dengan sistem kultur bioreaktor. Hal tersebut diperkuat oleh Panchalingam *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa teknik kultur *adherent* umumnya memiliki luas permukaan pertumbuhan sel sekitar 25-225 cm<sup>2</sup>. Menurut Taiani *et al.* (2013) Penggunaan teknik kultur pada luas permukaan 75 cm<sup>2</sup> dapat menghasilkan kira-kira  $10 \times 10^6$  sel dalam waktu 2-3 hari. Hal tersebut menandakan bahwa penggunaan sistem ini membutuhkan kurang lebih seribu *flask* dengan ukuran 75 cm<sup>2</sup> untuk memperoleh sel  $1 \times 10^{10}$  untuk kebutuhan aplikasi *stem cells*. Berbeda dengan sistem kultur bioreaktor, sistem kultur ini memiliki kemampuan memperbanyak sel hingga  $10^8$  dalam volume 100 mL.

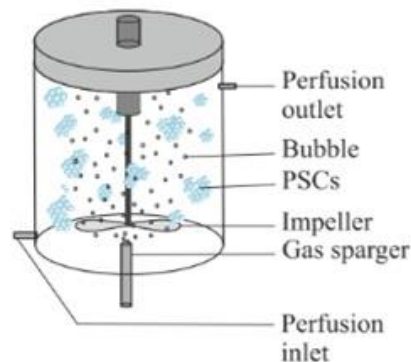
Pemanenan sel kultur pada sistem kultur konvensional yang merupakan kultur dua dimensi umumnya mudah dilakukan jika dibandingkan dengan kultur sel tiga dimensi. Hal ini diperkuat oleh Kurashima *et al.* (2019) sel kultur pada teknik *adherent* merupakan sel dua dimensi yang dapat dipisahkan secara sederhana pada permukaan kultur melalui enzimatik dan mekanis. Namun demikian, penggunaan metode tersebut pada dasarnya dapat menyebabkan kerusakan sel, sehingga berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas kultur yang diproduksi secara massal.

Selain itu, sistem kultur konvensional memiliki lingkungan kultur yang tidak homogen, sehingga menyebabkan interaksi sel yang kurang baik. Adapun pada sistem kultur bioreaktor seperti yang dijelaskan oleh Bilodeau dan Mantovani (2006) mampu memberikan lingkungan kultur yang homogen untuk pertumbuhan sel sehingga mendorong interaksi sel yang seragam. Hal ini diperkuat oleh Zweigerdt (2009) dan Kropp *et al.* (2017) bahwa lingkungan yang homogen pada kultur sel terjadi karena bioreaktor mampu mempromosikan kontrol agregat PSCs dan memberikan distribusi yang merata pada semua komponen, serta meningkatkan transfer massa gas maupun nutrisi ke dalam sel atau agregat. Kemampuan tersebut dapat memfasilitasi pengembangan proses kultur PSCs skala besar pada kepadatan sel yang relatif tinggi. Selain itu, menurut Kropp *et al.* (2017) sistem bioreaktor dilengkapi dengan teknologi yang mampu memantau dan mengendalikan lingkungan kultur. Beberapa faktor lingkungan yang mampu dikontrol pada sistem bioreaktor diantaranya yaitu suhu, pH, konsentrasi nutrisi (misalnya glukosa), metabolit (misalnya, laktat, amonia) dan gas (misalnya, O<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub>), sehingga secara substansial hal tersebut dapat memfasilitasi proses kultur yang terkontrol. Adapun perbandingan lainnya terkait sistem kultur bioreaktor pada Tabel 1 dapat dijelaskan sebagai berikut:

#### 1. *Stirred tank bioreactor*

*Stirred tank bioreactor* merupakan salah satu jenis sistem bioreaktor yang paling umum digunakan untuk memperbanyak kultur PSCs dalam skala besar (Olmer *et al.*, 2012). *Stirred tank bioreactor* biasanya terdiri dari *vessel* yang dilengkapi impeller internal (Eaker *et al.*, 2013). Impeller pada *stirred tank bioreactor* berfungsi untuk melakukan proses agitasi secara terus menerus dalam volume kultur yang besar, yaitu 50

mL – 200 L (Kempf *et al.*, 2015; Serra *et al.*, 2012). Adapun gambar *stirred tank bioreactor* dapat dilihat pada Gambar 11.



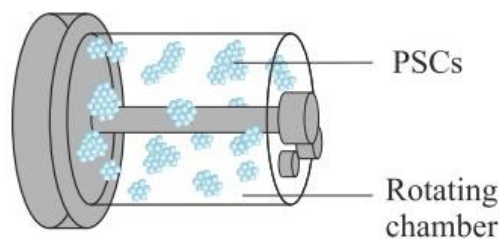
Gambar 11. *Stirred tank bioreactor*  
(Sumber: Torizal *et al.*, 2019)

Sistem *stirred tank bioreactors* umumnya memiliki intensitas agitasi yang baik. Intensitas agitasi tersebut berhubungan dengan fleksibilitas kultur sel dalam bioreaktor sehingga interaksi dalam sel kultur dapat terjadi (Nienow *et al.*, 2016). Adapun keunggulan utama sistem bioreaktor ini ialah pemantauan dan pengendalian kultur sel dapat sangat mudah dilakukan. Beberapa pemantauan kondisi kultur sel seperti pH, O<sub>2</sub>, suhu dan konsentrasi biomassa sel dapat dilakukan secara berkala melalui fitur online sistem *stirred tank bioreactor* (Eaker *et al.*, 2013; Want *et al.*, 2012).

## 2. *Rotating wall bioreactor*

*Rotating wall bioreactor* merupakan bioreaktor yang terdiri dari bejana kultur silinder (Gerecht-Nir *et al.*, 2004). Sistem ini dicirikan oleh rotasi permanen pada ruang kultur, kecepatan rotasi dalam bioreaktor ini dapat disesuaikan untuk menghasilkan keadaan jatuh bebas (Bilodeau dan Mantovani, 2006). Rotasi yang dilakukan dalam bioreaktor akan mendukung pencampuran kultur yang baik dan dengan demikian terjadi homogenitas dari keseluruhan kultur (Gerecht-Nir *et al.*, 2004).

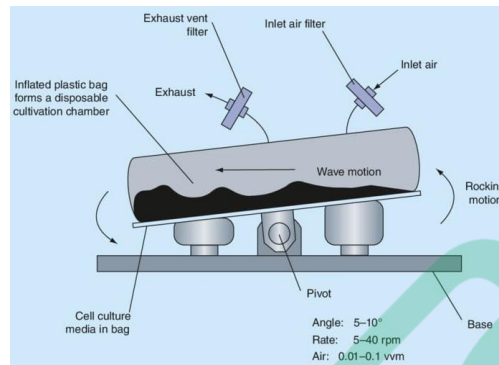
Produktifitas yang tinggi pada sistem *rotating wall bioreactor* umumnya mudah dicapai. Hal tersebut dikarenakan sistem ini memiliki efek *shear stress* yang rendah (Rodrigues *et al.*, 2011). Namun demikian, *rotating wall bioreactor* memiliki penggunaan volume kultur yang efektif yaitu kurang dari 10 L (Stephenson dan Grayson, 2018). Adapun gambar *rotating bioreactor* dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. *Rotating wall bioreactor*  
(Sumber: Torizal *et al.*, 2019)

### 3. Wave bioreactor

*Wave bioreactor* merupakan bioreaktor yang terdiri dari kantong kultur sekali pakai yang sebagian diisi dengan medium dan diinokulasi dengan sel. Kantong tersebut umumnya di pompa dengan udara. Selanjutnya, kantong kultur ditempatkan pada suatu platform khusus yang mampu menggerakkan atau menggoyangkan kultur sel melalui gelombang antarmuka cairan dan udara. (Rodrigues *et al.*, 2011). Adapun gambar *wave bioreactor* dapat dilihat pada Gambar 13.

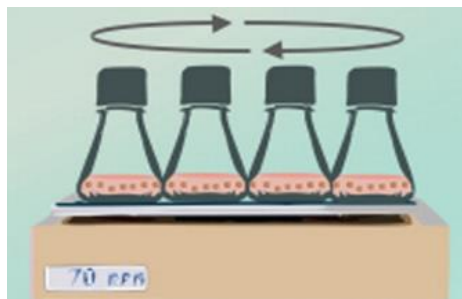


Gambar 13. *Wave bioreactor*  
(Sumber: Merten *et al.*, 2015)

*Wave bioreactor* merupakan jenis bioreaktor yang sesuai dengan aplikasi klinis (Rodrigues *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2013). Hal ini dikarenakan resiko kontaminasi pada kultur sangat minim, kultur dapat dikontrol secara ketat (Rodrigues *et al.*, 2011) dan mampu meminimalisir *shear stress* (Zhan *et al.*, 2019). Selanjutnya, *Wave bioreactor* memiliki penggunaan volume kultur hingga 500 L (Singh, 2019; Zhan *et al.*, 2019).

### 4. Rotating erlenmeyer flask bioreactor

Rotating Erlenmeyer merupakan sistem kultur suspensi dengan memanfaatkan gerakan rotasi secara horizontal sehingga terjadi gerakan pengadukan pada kultur media. Metode kultur ini dilakukan dengan menggunakan *erlenmeyer flask* yang ditempatkan pada *rotary shaker* yang dapat disesuaikan gerakan rotasinya sehingga PSCs yang ada di dalam media akan teragregasi dan membentuk struktur seperti bola yang dikenal dengan nama *spheroid* (Sahabian, 2019). Sistem ini mampu menyediakan lingkungan kultur yang homogen dengan pengadukan tidak langsung melalui gerakan rotasi pada medium. Adapun gambar *rotating erlenmeyer flask bioreactor* dapat dilihat pada Gambar 14.



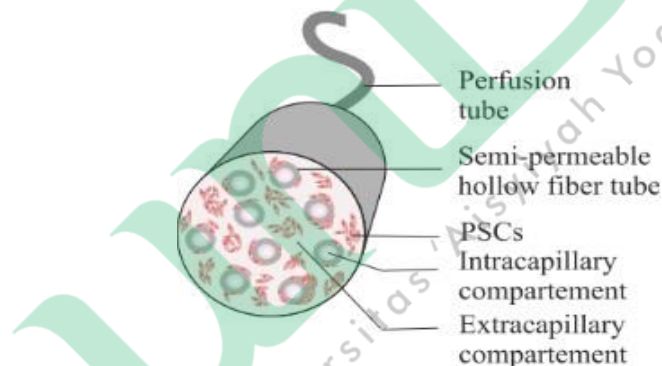
Gambar 14. *Rotating erlenmeyer flask bioreactor*  
(Sumber: Kempf *et al.*, 2015)



### 5. *Hollow fiber bioreactor*

*Hollow fiber bioreactor* merupakan bioreaktor dengan sistem dua kompartemen yang terdiri dari bundle serat berongga yang terbungkus dalam cangkang silinder (Godara *et al.*, 2008). Kompartemen pertama adalah ruang interkapiler dalam serat berlubang, sedangkan kompartemen kedua adalah ruang ekstrakapiler yang mengelilingi serat berlubang (Martin dan Vermette, 2005). Umumnya, sel-sel dibiakan dalam ruang ekstrakapiler dan media ditempatkan melalui ratusan hingga ribuan ruang interkapiler. Nutrisi berdifusi melalui serat yang biasanya terbuat dari selulosa asetat, sementara produk limbah hasil metabolit sel kultur akan berdifusi ke dalam serat ekstrakapiler dan sewaktu-waktu dapat dibuang (Warnock dan Al-Rubei, 2006).

Kompartemen pada jenis bioreaktor ini memberikan keuntungan utama, yaitu dapat mensuplai faktor pertumbuhan secara terus menerus, sehingga dapat mencegah kurangnya nutrisi pada sel dan akumulasi metabolit beracun (Khun *et al.*, 2003). Kompartemen yang terpisah pada bioreaktor juga mampu memberikan efek lingkungan stress yang rendah, sehingga sifat pluripotensi dan viabilitas PSCs dapat bertahan dengan baik (Warnock dan Al-Rubei, 2006). Dalam kondisi tersebut, penggunaan *hollow fiber bioreactor* mampu memperoleh kepadatan sel yang tinggi, yaitu  $10^9$  sel/mL. Namun demikian, sistem *hollow fiber bioreactor* sering kali memiliki masalah dalam sistem kultur, antara lain terjadinya gradient nutrisi dan oksigen yang menyebabkan kondisi pertumbuhan sel kultur menjadi tidak homogen (Khun *et al.*, 2003). Adapun gambar *hollow fiber bioreactor* dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. *Hollow fiber bioreactor*  
(Sumber: Torizal *et al.*, 2019)

### 6. *Microcarrier* dan mikroenkapsulasi

Sistem kultur konvensional statis dapat dioptimalkan melalui penggunaan sistem kultur bioreaktor. Teknik kultur ini disebut sebagai teknik kultur *adherent* yang dadaptasikan pada teknik kultur suspensi. Berdasarkan teknisnya, biomanufaktur kultur PSCs ini dioptimalkan dengan penggunaan *microcarrier* dan mikroenkapsulasi pada sel kultur. Penggunaan *microcarrier* dan mikroenkapsulasi terbukti mampu memberikan manfaat untuk kultur PSCs. *Microcarrier* secara umum dapat memperluas permukaan kultur. Hal ini diperkuat oleh Dame dan Varani (2008) dan Lock dan Tzanakakis (2009) yang menyatakan bahwa penggunaan *microcarrier* berperan dalam mengoptimalkan kultur konvensional statis melalui perluasan permukaan sel kultur. Penggunaan *microcarrier* dalam kultur sel dapat menyediakan area permukaan untuk pelekatan dan

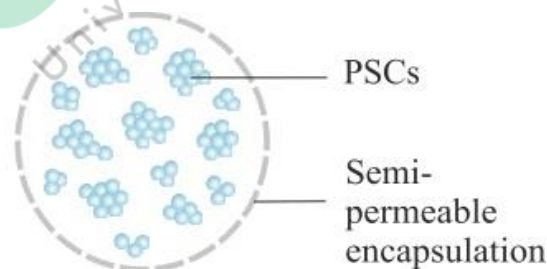
proliferasi sel. Selanjutnya, penggunaan *microcarrier* juga dapat memberikan keuntungan utama pada sistem bioreaktor, yaitu dapat menampung lebih banyak sel dan kultur dapat menempati lebih sedikit ruang di bioreaktor.

*Microcarrier* umumnya terbagi atas dua jenis, yaitu *microcarrier* tidak berpori dan *microcarrier* berpori. *Microcarrier* tidak berpori merupakan jenis pendukung sel yang mampu memberikan kesempatan pada sel kultur untuk tumbuh dipermukaan bola berdiameter kecil. Adapun *microcarrier* berpori merupakan *microcarrier* yang memiliki pori-pori pada permukaannya. Adapun gambar *microcarrier* tidak berpori dan berpori dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. *Microcarrier*: tidak berporos (A), berporos (B)  
(Sumber: Torizal *et al.*, 2019)

Menurut Park *et al.* (2013) dan Li *et al.* (2015) *microcarrier* tidak berpori mampu memberikan beberapa keuntungan lainnya, yaitu memberikan nutrisi dan pertumbuhan sel yang homogen pada sel kultur yang tumbuh pada permukaan bola berdiameter kecil. Namun demikian, penggunaan *microcarrier* tidak berpori dapat menyebabkan kerusakan sel akibat terjadinya beberapa tegangan geser dan gesekan karena kontak langsung yang terjadi antara sel dan media kultur sel. Sementara itu, berdasarkan Park *et al.* (2013) *microcarrier* berpori memiliki kemampuan untuk melindungi sel dari tegangan geser dan gesekan yang disebabkan oleh agitasi dan aerasi dalam bioreaktor. Hal tersebut terjadi karena *microcarrier* berpori memiliki pori-pori dan saluran yang cukup besar sebagai tempat sel masuk dan tumbuh di dalamnya. Adapun gambar mikroenkapsulasi dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Mikroenkapsulasi  
(Sumber: Torizal *et al.*, 2019)

Selain *microcarrier*, mikroenkapsulasi juga dapat digunakan sebagai pendukung pertumbuhan sel pada sistem kultur. Mikroenkapsulasi berkerja untuk menyelubungi sel kultur dan berfungsi untuk melindungi sel dari *shear stress*. Menurut Uludag *et al.* (2000)

dan Torizal *et al.* (2019) sel kultur dapat terlindung dari *shear stress* karena adanya lapisan membran semi permeabel mikroenkapsulasi yang menyelubungi sel kultur. Selanjutnya, pertukaran nutrisi dan limbah pada sel melalui membran semi permeable tersebut juga dapat terjadi. Dengan demikian, hal tersebut mampu mencegah diferensiasi PSCs secara spontan.

## **KESIMPULAN**

Beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam memilih metode biomanufaktur PSCs yang ideal berdasarkan kondisi lingkungan kultur PSCs ialah media pertumbuhan, matriks ekstraseluler, oksigen, pH dan kondisi *shear stress*. Teknik kultur PSCs dapat dilakukan melalui tiga macam teknik, yaitu teknik *adherent*, teknik suspensi dan teknik *adherent* yang diadaptasikan ke dalam teknik suspensi. Teknik kultur suspensi atau kultur *adherent* yang diadaptasikan pada kultur suspensi merupakan teknik yang baik untuk digunakan dalam produksi PSCs skala besar. Penggunaan teknik kultur suspensi atau kultur *adherent* yang diadaptasikan pada kultur suspensi sebagai biomanufaktur PSCs dapat mampu dioptimalkan dengan penggunaan sistem bioreaktor.

## **SARAN**

Produksi skala besar PSCs perlu mempertimbangkan penggunaan media pertumbuhan yang baik dan faktor lingkungan lainnya seperti oksigen. Hal tersebut membuat media pertumbuhan dan faktor lingkungan lainnya perlu diperoleh informasi lebih lanjut. Selain itu, kontrol kondisi lingkungan kultur dan pengendalian resiko *shear stress* pada penggunaan bioreaktor perlu dipertimbangkan dan diperoleh informasi lebih lanjut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, S., Sheridan, S.D., Miller, B and Rao, R.R. (2010). Stable propagation of human embryonic and induced pluripotent stem cells on decellularized human substrates. *Bioechnology Progress*. 26(4):1126-1134.
- Abecasis. B., Aguiar, T., Arnault, E., Costa, R., Alves, P.G., Aspergen, A., Serra, M., Alves, P.M. (2017). Expansion of 3D human induced pluripotent stem cell aggregates in bioreactors: bioprocess intensification and scaling-up approaches. *Journal of Biotechnology*. 246:81-93.
- Abbasalizadeh, S., Larijani, M, R., Sammadian, A and Baharvand, H. (2012). Bioprocess development for mass production of size-controlled human pluripotent stem cell aggregates in stirred suspension bioreactor. *Tissue Engineering*. 18(11):831-851.
- Amit, M., Chebath, J., Margulets, V., Laevsky, H., Miropolsky, Y., Shariki, K., Peri, M., Blais, I., Slutsky, G., Revel, M and Eldor, J.I. (2010). Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. 6(2):248-259.
- Badenes, S.M., Fernandes, T.G., Rodrigues, C.A.V., Diogo, M.M and Cabral, J.M.S. (2015). Scalable expansion of human-induced pluripotent stem cells in xeno-free microcarriers. *Methods in Molecular Biology*. 1238:23-29.
- Bilodeau, K and Mantovani, D. (2006). Bioreactors for tissue engineering: focus mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Engineering*. 12(8):2367-2383.
- Chayosumrit, M., Tuch, B and Sidhu, K. (2010). Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm. *Biomaterials*. 31(3):505-514.
- Chen, K.G., Mallon, B.S., McKay, R.D.G and Robey, P.G. (2014). Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion and therapeutics. *Cell Stem Cell*. (14): 13-26.
- Chen, G., Gulbranson D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Otto, K.S., Howden, S.E., Diol, Nicole, R., Propson, N.E., Wagner, R., Lee, G.O., Bourget, J.A., Teng, J.M.C and Thomson, J.A. (2011). Chemical defined conditions for human iPS cell derivation and culture. *Nat Methods*. 8(5):424-429.
- Chen, V.C and Couture, L.A. (2015). The suspension culture of undifferentiated human pluripotent stem cells using spinner flasks. *Methods in Molecular Biology*. 1283:13-21.
- Come, J., Nissan, X., Aubry, L., Toumos, J., Girard, M., Perrier, A.L., Peschanski, M and Cailleret, M. (2008). Improvement of culture conditions of human embryoid bodies using a controlled perfused and dialyzed bioreactor system. *Tissue Engineering*. 14(4):289-298.
- Dame, M.K and Varani, J. (2008). Recombinant collagen for animal product-free dextran microcarriers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 44(10):407-414.
- Dakhore, S., Nayer, B and Hasegawa, K. (2018). Human pluripotent stem cell culture: current status, challenges and advancement. *Stem Cells International*. 2018: 1-17.
- Eaker, S., Armant, M., Brandwein, H., Burger, S., Campbell, A., Carpenito, C., Clarke, D., Fong, T., Karnieli, O., Niss, K., Hof, W.V and Wagey, R. (2013). Concise review: guidance in developing commercializable autologous/patient-specific cell therapy manufacturing. *Stem Cells Translational Medicine*. 2(11):871-833.
- Edmonson, R. Broglie, R.R., Adcock, A.F and Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell based biosensor. *Assay and Drug Development Technologies*. 12(4):207-218.

- Ellerstrom, C., Strehli, R., Moya, K., Andersson, K., Bergh, C., Lundin, K., Hyllner, J dan Semb, H. (2006). Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells*. 24:2170-2176.
- Fernandes, A.M., Fernandes, T.G., Diogo, M.M., Silva, L., Henrique, D., Cabral, J.M.S. (2007). Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of Biotechnology*. 132(2):227-236.
- Fernandes, T.G., Diogo, M.M and Cabral, J.M.S and Cabral, J.M.S. 2013. *Stem Cell Bioprocessing for Cellular Therapy Diagnostics and Drug Development*, Woodhead Publishing, Philadelphia.
- Fernandes, T.G., Diogo, M.M and Cabral, J.M.S and Cabral, J.M.S. 2013. *Stem Cell Bioprocessing for Cellular Therapy Diagnostics and Drug Development*, Woodhead Publishing, Philadelphia.
- Friedly, K.M., Kinney, M.A., McDevitt, T.C. (2012). Hydrodynamic modulation of pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 3(6):1-9.
- Gupta, P., Hourigan, K., Jadhav, S., Bellare, J and Verma, P. (2017). Effect of lactate and pH n mouse pluripotent stem cells: importance of media analysis. *Biochemical Engineering Journal*. 118:25-33.
- Giobbe GG, Zagallo M, Riello M, Serena E, Masi G, Barzon L, Di Camillo B and Elvassore N. (2012). Confined 3D microenvironment regulates early differentiation in human pluripotent stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(12):3119-3132.
- Gerecht-Nir, S., Cohen, S and Eldor, J.I. (2004). Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnology and Bioengineering*. 86(5):493-502.
- Godara, P., McFarland, G.D and Nordon, R.E. (2008). Mini-review design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83:408-420.
- Halim, D., Murti, H., Sandra, F., Boediono, A., Djuwantono, T, Setiawan, B. 2013. *Stem Cell Dasar Teori dan Aplikasi Klinis*, Erlangga, Jakarta.
- Horiguchi, I., Urabe, Y., Kimura, K and Sakai, Y. (2018). Effects of glucose, lactate and basic FGF as limiting factors on the expansion of human induced pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111-115.
- Horiguchi, I., Chowdhury, M.M and Sakai, Y. (2014). Proliferation, morphology and pluripotency of mouse induced pluripotent stem cells in three different types of alginate beads for mass production. *Biotechnology Progress*. 30(4):896-904.
- Horiguchi, I and Sakai, Y. (2015). Alginate encapsulation of pluripotent stem cells using a coaxial nozzle. *Journal of Visualized Experiments*.(101):1-7.
- Hwang, Y., Cho, J., Tay, F., heng, J.Y.Y., Ho, R., Kazarian, S.G., Williams, D.R., Boccaccini, A.R., Polak, J.M and Mantalaris, A. (2009). The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. *Biomaterials*. 30(4):499:507.
- Ikeda, Y., Miyoshi, H and Nagasaki, Y. (2016). Design of oxidative biointerface for separation of hematopoietic stem cells with high maintenance of undifferentiated phenotype. *Journal of Biomedical Materials Research*. 104(8):2080-2085.



- Ji, J., Sharma, V., Qi, S., Guarch, M.E., Zhao, P, Lup, Z., Fan, W., Wang, Y., Mbabaali, F., Neculai, D., Esteban, M.A., McPherson, J.D and Batada, N. (2014). Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2:44-51.
- Keller, K.C., Rodrigues, B and Nieten, N.I. (2014). Suspension culture of pluripotent stem cells: effect of shear stress on stem cell fate. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 24(1):1-13.
- Kehoe, D.E., Jing, D., Lock, L.T and Tzanakakis, E.S. (2010). Scalable stirred suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. *Tissue Engineering*. 16(2):405-421.
- Kempf, H., Andree, B and Zweigerdt, R. (2015). Large-scale production of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1-13.
- Kinney, A., Sargent, C.Y and McDevitt, T.C. (2011). The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. *Tissue Engineering*. 17(4):249-262.
- Killberg, M.S., Terada, N and Shan, J. (2016). Influence of amino acid metabolism on embryonic stem cell function and differentiation. Supplement. 7(4):780-789.
- Kurashima, Y., Imashiro, C., Hirano, M., Kuribara, T., Totani, K., Ohnuma, K., Friend, J and Takemura, K. (2019). Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic travelling waves. *Communications Biology*. 2(1):1-11.
- Kurniati, T. 2020. *Biologi Sel*, CV. Cendekia Press, Bandung.
- Kropp, C., Massai, D and Zweigerdt, R. (2017). Progress and challenges in large scale expansion of human pluripotent stem cells. *Process Biochemistry*. 59:244-254.
- Krawetz, R., Taiani, J.T., Liu, S., Meng, G., Li, X., Kalos, M.S and Rancourt, D.E. (2010). Large-scale expansion of pluripotent human embryonic stem cells in stirred suspension bioreactors. *Tissue Engineering*. 16(4):573-582.
- Knospel, F., Freyer, N., Stecklum, M., Gerlach, J.C and Zeilinger, K. (2016). Periodic harvesting of embryonic stem cells from a hollow-fiber membrane based four-compartment bioreactor. *Biotechnology Progress*. 32(1):141-151.
- Kropp, C., Massai, D and Zweigerdt, R. (2017). Progress and challenges in large scale expansion of human pluripotent stem cells. *Process Biochemistry*. 59:244-254.
- Kwok, C., K., Ueda, Y., Kadari, A., Gunther, A., Ergun, S., Heron, A., Schnitzler, A.C., Rook, M and Edenhofer, F. (2018). Scalable stirred suspension culture for the generation of billions of human induced pluripotent stem cells using single-use bioreactors. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 12(2):1076-1087.
- Larijani, B., Esfahani, E.N., Amini, P., Nikbin, B., Alimoghaddam, K., Amiri, S., Malekzadeh, R., Yazdi, N.M., Ghodsi, M., Dowlati, Y., Sahraian, M.A and Ghavamzadeh, A. (2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Medica Iranica*. 50 (2):79-96.
- Le, M.N.T and Hasegawa, K. (2019). Expansion culture of human pluripotent stem cells and production of cardiomyocytes. *Bioengineering* 6(48):1-24.
- Levenberg, S., Khademhossein, A and Langer, R. 2014. *Embryonic Stem Cells in Tissue Engineering*, Elsevier, Oxford.
- Li, W., Han, Y., Yang, H., Wang, G., Lan, R and Wang, J. (2015). Preparation of microcarriers based on zein and their application in cell culture. *Materials Science and Engineering*. 58:863-869.
- Liu, J., Qin, X., Dongfenpan., Zhang, B and Jin, F. (2019). Amino acid mediated metabolism: a new power properties of stem cells. *Stem Cells International*. 2019:1-9.

- Lock, L.T and Tzanakakis, E.S. (2009). Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-suspension culture. *Tissue Engineering*. 15(8):2051-2063.
- Madl, C.M., Heilshorn, S.C and Blau, H.M. (2018). Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. *Nature*. 227(7705):335-342.
- Manello, F dan Tonti, G.A. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!. *Stem Cells*. 25:1603-1609.
- Martin, Y and Vermetter, P. (2005). Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization and recent advances. *Biomaterials*. 26:7482-7503.
- Merten, O.W. (2015). Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 370:1-22.
- Merten, O.W. (2015). Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 370:1-22.
- McKee, C and Chaudhry, G.R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 159:62-77.
- Nakashima, Y and Omas, T. (2016). What kind of signaling maintains pluripotency and viability in human-induced pluripotent stem cells cultured on laminin-511 with serum-free medium?. *Bioresearch Open Access*. 5(1):84-93.
- Nath, S.C., Horie, M., Nagamori, E and Kino-oka, M. (2017). Size and time dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 124(4):469-475.
- Nienow, A.W., Coopman, K., Heathman, T.R.J., Rafiq, Q.A and Hewitt, C.J. 2016. *Bioreactor Engineering Fundamentals for Stem Cell Manufacturing*, Elsevier, Oxford.
- Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U and Zweigerdt, R. (2012). Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors. *Tissue Engineering*. 18(10):772-784.
- Ouyang, A., Ng, R and Yang, S. (2007). Long-term culturing of undifferentiated embryonic stem cells in conditioned media and three-dimensional fibroblast matrices without extracellular matrix coating. *Stem Cells*. 25:447-454.
- Otjusi, T.G., Bin, J., yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Itsunari, M., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J.E., Nishino, T., Hasegawa, K and Nakatsuji, N. (2014). A 3d sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell reports*. 2:734-7345.
- Pauklin, S and Vallier, L. (2015). Activin/nodal signaling in stem cells. *Development*. 142:607-619.
- Panchalingam, K.M., Jung, S., Rosenberg, L and Behie, L. (2015). Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem Cell Research & Therapy*. 6(1):1-10.
- Park, J., Perez, R.A., Jin, G., Chi, S., Kim, H and Wall, I.B. (2013). Microcarriers designed for cell culture and tissue engineering of bone. *Tissue Engineering*. 12(2): 172-190.
- Pei, F., Jiang, J., Bai, S., Cao, H., Tian, L., Zhao, Y., Yang, C., Dong, H., Ma, Yue. (2017). Chemical defined and albumin free generation of human atrial and ventricular myocytes from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*. 19: 94-103.

- Piza, I.R., Patin, Y.R., Vassena, R., Gonzalez, F., Barrero, M.J., Veiga, A., Raya, A., Belmonte, J.C.I. (2009). Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xenofree conditions. *Stem Cells*. 28:36-44.
- Roberts, I., Baila, S., Rice, R.B., Janssens, M.E., Nguyen, K., Moens, N., Ruban, L., Hernandez, D., Coffey, P and Mason, C. (2012). Scale-up of human embryonic stem cell culture using a hollow fibre bioreactor. *Biotechnology Letter*. 34(12):2307-2315.
- Rodrigues, C., Fernandes, T.G., Diogo, M.M., Silva, C.L., Cabral, J.M.S. (2011). Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnology Advances*. 29(6):815-829.
- Sahabian, A., Sgodda, M., Naujok, O., Dettmer, R., Dahlmann, J., Manstein, F., Cantz, T., Zweigerdt, R., Martin, U and Olmer, R. (2019). Chemically-defined, xeno-free, scalable production of hPSC-derived definitive endoderm aggregates with multi-lineage differentiation potential. *Cells*. 4(12):1-19.
- Santos, F.F., Andrade, P.Z., Silva, C.L and Cabral, J.M.S. (2013). Bioreactor design for clinical-grade expansion of stem cells. *Biotechnology Journal*. 8(6):664-654.
- Serra, M., Brioto, C., Correia, C and Aives, P.M. (2012). Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends in Biotechnology*. 30(6): 350-359.
- Serra, M., Brioto, C., Correia, C and Aives, P.M. (2012). Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends in Biotechnology*. 30(6): 350-359.
- Siti-ismail, N., Bishop, A.E., Polak, J.M and Mantalaris, A. (2008). The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance. *Biomaterials*. 29(29):3946-3952.
- Singh, H., Mok, p., Balakrishnan, T., Rahmat, S.N.B., Zweigerdt, R. (2010). Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. 4(3):165-179.
- Simonson, O., Domogatskaya, A., Volchkov, P and Rodin, S. (2015) The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment. *Annals of Medicine*. 47: 370-380.
- Sahabian, A., Sgodda, M., Naujok, O., Dettmer, R., Dahlmann, J., Manstein, F., Cantz, T., Zweigerdt, R., Martin, U and Olmer, R. (2019). Chemically-defined, xeno-free, scalable production of hPSC-derived definitive endoderm aggregates with multi-lineage differentiation potential. *Cells*. 4(12):1-19.
- Shafa, M., Sjonnesen, K., Yamashita, A., Liu, S., Michalak, M., Kallos, M.S and Rancourt, D.E. (2012). Expansion and long-term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 6(6): 462-472.
- Shaban, S., El-Husseney, M.W.A., Abushouk, A.I., Salem, A.M.A., mamdouh, M., Daim, M.M.A. (2017). Effects of antioxidant supplements on the survival and differentiation of stem cells. *Hindawi*. 2017:1-16.
- Shen, J., Ly, K and Hoang, Y. 2012. Culture Medium, Elvisier.
- Stephenson, M and Grayson, W. (2018). Recent advances in bioreactors for cell-based therapies (versions 1; referees; 2 approved). *F1000Research*. 7:1-9.
- Spyrou, J, Gardner, D.K and Harvey, A.J. (2019). Metabolism is a key regulator of induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells International*. 2019:1-10.
- Taiani, J.T., Shafa, M and Rancourt, D.E. 2013. *Bioreactor Expansion of Pluripotent Stem Cells*, Humana Press, New York.

- Tamm, C., Galito, S.P and Anneren, C. (2013). A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *Plos One*. 8:1-10.
- Torizal, F. G., Horiguchi, I and Sakai, Y. (2019). Physiological microenvironmental conditions in different scalable culture systems for pluripotent stem cells expansion and differentiation. *The Open Biomedical Engineering Journal*. 13: 41-54.
- Uludag, H., Vos, P.D and tresco, P.A. (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery*. 42:29-64.
- Usta, S.N., Scharer, C.D., Xu, J., Frey, T.K., Nash, R.J. (2014). Chemically defined serum-free and xeno-free media for multiple cell lineages. *Annals of Translational Medicine*. 2(10):97-106.
- Vallier, L., Alexander, M and Pedersen, R.A. (2005). Activin/nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. 118(19):4495-4509.
- Villa-Diaz, L.G., Ross, A.M., Lahann, J and Krebsch. (2013). Concise review: the evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells*. 31:1-7.
- Votteler, M., Kluger, P., Walles, H and Layland, K.S. (2010). Stem cell microenvironments – unveiling the secret of how stem cell fate is defined. *Macromolecular Bioscience*. 10:1302-1315.
- Wang, D., Liu, W., Han, B and Xu, R. (2005). The bioreactor: a powerful tool for large scale culture of animal cells. *Current Pharmaceutical*. 6(5):397-403.
- Wang, Y., Chou, B., Dowey, S., He, C., Gerecht, S and Cheng, L. (2013). Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions. *Stem Cell Research*. 11(3):1103-1116.
- Want, A.J., Nienow, A.W., Hewitt, C.J and Coopman, K. (2012). Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purpose: beyond the t flask. *Regenerative Medicine*. 7(1):71-84.
- Warnock, J and Al-Rubei, M. (2006). Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *Biotechnology and Applied Bichemistry*. 45(1):1-12.
- Wilson, J.L., Najia, M.A., Saeed, R and McDevitt, T.C. (2013). Alginate encapsulation parameters influence the differentiation of microencapsulated embryonic stem cell aggregates. *Biotechnology and Bioengineering*. 111(3):618-631.
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T and Yamanka, S. Hypoxia enhance the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4:237-241.
- Yue, X., Fujishiro, M., Nishioka, C., Arai, T., Takahashi, E., Gong, J., Akaike, T and Ito, Y. (2012). Feeder cells support the culture of induced pluripotent stem cells even after chemical fixation. *Plos One*. 7:1-9.
- Zhan, C., Hargot, E., Brandt, L and Chotteau, V. (2019). Study of hydrodynamics in wave bioreactors by computational fluid dynamics reveals a resonance phenomenon. *Chemical Engineering Science*. 193:53-65.
- Zweigerdt, R. (2009). Large scale production of stem cells and their derivatives. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 114:201-235.

