

Pengkulturan dan Pencirian Penanda Molekul Sel Stem Manusia daripada Pulpa Gigi Susu (SHED) dan Gigi Kekal (DPSC) (Culture and Molecular Markers Characterization of Stem Cells from Human Deciduous (SHED) and Permanent (DPSC) Teeth Pulp)

SHAHRUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN*, THANALETCHUMI MANOGARAN, INTAN ZARINA ZAINOL ABIDIN,
ZAIDAH ZAINAL ARIFFIN & ROHAYA MEGAT ABDUL WAHAB

ABSTRAK

Sel stem pulpa gigi manusia yang dipencilkan daripada tisu pulpa gigi merupakan sel stem dewasa bersifat multipoten. Objektif kajian ini adalah untuk mengenal pasti teknik pengkulturan in vitro sel stem pulpa gigi susu (SHED) dan gigi kekal (DPSC) melalui penentuan pasaj, kesan eraman tripsin-EDTA dan potensi proliferasi serta untuk mencirikan kedua-dua sel ini melalui profil penanda molekul. Kaedah pencernaan enzim digunakan pada tisu pulpa gigi susu dan gigi kekal masing-masing untuk pemencilan sel SHED dan DPSC. Kedua-dua sel dikulturkan daripada pasaj 1 hingga 5 dan pewarnaan tripan biru digunakan untuk memperoleh lengkung pertumbuhan bagi menentukan masa penggandaan populasi sel (PDT) pada setiap pasaj. Kesan tripsin-EDTA terhadap kedua-dua sel dikaji menggunakan pewarnaan Alamar biru untuk menentukan masa eraman yang optimum semasa proses pengsubkulturan. Potensi proliferasi in vitro bagi kedua-dua sel selama 21 hari ditentukan melalui asai 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Pencirian kedua-dua sel melalui pengekspresan penanda biologi molekul ditentukan melalui pendekatan RT-PCR. Morfologi kedua-dua sel didapati menyerupai sel fibroblas pada kesemua pasaj. Sel SHED dan DPSC pada pasaj 3 menunjukkan PDT terendah iaitu masing-masing 43 ± 2.3 dan 63 ± 3.1 jam. Pendedahan SHED terhadap tripsin-EDTA menunjukkan penurunan peratus sel viabel berbanding DPSC. Pertumbuhan sel SHED didapati ~2.3 kali ganda lebih tinggi berbanding DPSC. Pencirian molekul kedua-dua sel menunjukkan pengekspresan penanda sel stem mesekima dan bukannya penanda sel stem hematopoietik. Kesimpulannya, morfologi sel yang homogenus dan nilai PDT terendah yang ditunjukkan oleh sel daripada pasaj 3 menjadikannya pasaj terbaik untuk menentukan potensi proliferasi sel dan pengekspresan penanda molekul. SHED didapati mampu berproliferasi dengan lebih baik berbanding DPSC. Walau bagaimanapun, DPSC lebih rentan terhadap tripsin-EDTA berbanding SHED. Pencirian molekul pula mendapati kedua-dua sel merupakan sel stem jenis mesenkima.

Kata kunci: Kesan tripsin-EDTA; masa penggandaan sel; potensi proliferasi; profil penanda biologi molekul; sel stem pulpa gigi manusia

ABSTRACT

Human dental pulp stem cells are adult multipotent stem cells isolated from dental pulp tissue. Our objective was to determine in vitro culture technique for stem cells from deciduous tooth (SHED) and permanent tooth (DPSC) through cell passage identification, the effect of trypsin-EDTA and proliferation potential, and to characterize both cells using molecular markers profile. Enzyme digestion method was used on dental pulp tissue from deciduous and permanent tooth for SHED and DPSC isolation, respectively. Both cells were cultured at passage 1 until 5 and trypan blue assay was used to obtain growth curve in determining cell population doubling time (PDT) for each passage. Effect of trypsin-EDTA on both cells were studied using Alamar blue assay to determine optimum incubation time for subculturing process. Cell proliferation potential for both cells within 21 days was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cell characterization through molecular biology markers was performed using RT-PCR. Both cells at all passages appeared fibroblast-like. SHED and DPSC at passage 3 exhibited the lowest PDT with 43 ± 2.3 and 63 ± 3.1 h, respectively. SHED exposed to trypsin-EDTA showed decrease in cell viability percentage compared to DPSC. Cell growth for SHED was ~2.3-fold higher than DPSC. Both cells expressed mesenchymal stem cell markers and not hematopoietic stem cell markers. In conclusion, homogenous morphology and lowest PDT value indicated that cells at passage 3 are the best to determine proliferation potential and molecular markers expression. SHED proliferated better than DPSC. However, DPSC was more resistant to trypsin-EDTA than SHED. Based on molecular marker profile, both cells are mesenchymal stem cells.

Keywords: Cell doubling time; human dental pulp stem cells; molecular biology markers profile; proliferation potential; trypsin-EDTA effect

PENDAHULUAN

Sel stem daripada pelbagai sumber telah dikulturkan secara *in vitro* bagi menentukan potensinya dalam rawatan regenerasi tisu. Sel stem yang diasingkan daripada pulpa gigi susu (SHED) dan gigi kekal (DPSC) merupakan sel stem dewasa yang bersifat multipoten. Tisu pulpa gigi terletak di dalam ruangan pulpa gigi yang terdiri daripada kapilari darah, sel odontoblas bagi pembentukan dentin, matriks berkolagen dan sel stem yang berfungsi untuk mengekalkan kesihatan gigi (Farges et al. 2009). Antara potensi kegunaan sel stem pulpa gigi dalam terapi termasuklah regenerasi tisu untuk penyerapan akar gigi, kerosakan kraniomaksilofasial, retakan dan nekrosis tulang (Grayson et al. 2015; Shahrul Hisham et al. 2017).

Sel stem daripada tisu pulpa gigi boleh dipencilkan samada menggunakan pendekatan pengkulturan eksplan atau pencernaan enzim. Menurut Jeon et al. (2014), pencernaan tisu pulpa gigi menggunakan enzim kolagenase jenis I bukan sahaja berupaya menyingkirkan kotoran kecil tetapi membantu dalam pelekatan serta penyebaran sel stem di dalam kelalang pengkulturan *in vitro*. Berdasarkan kepada kebolehan proliferasi dan pembezaan kepada osteoblas, SHED dan DPSC yang dipencilkan secara pencernaan enzim menunjukkan potensi yang lebih baik daripada teknik eksplan (Karamzadeh et al. 2012; Souza et al. 2015). Oleh itu, dalam kajian ini, SHED dan DPSC dipencilkan melalui pencernaan enzim.

Pencirian SHED dan DPSC adalah penting supaya potensi proliferasi dan pembezaan sel stem kepada pelbagai sel matang dalam keadaan *in vitro* dapat dikenal pasti. Kefahaman yang menyeluruh tentang aktiviti sel pada tahap molekul melalui penanda molekul yang khusus juga dapat membantu dalam menentukan potensi sel bagi penggunaannya untuk rawatan berasaskan sel. Pasaj optimum adalah penting untuk analisis seterusnya seperti analisis penentuan potensi proliferasi sel dan pengepresan penanda molekul. Hal ini kerana peningkatan kepada bilangan pasaj sel akan menyebabkan berlakunya penurunan kepada kadar pembahagian dan potensi pembezaan sesuatu sel disebabkan oleh pemendekan telomer (Wagner et al. 2009).

Sel yang ditanggalkan dari permukaan dasar kelalang menggunakan pendekatan tripsin-EDTA semasa pengkulturan secara *in vitro* boleh memberikan kesan ke atas viabiliti sel serta keupayaan sel dalam pelekatan, penyebaran dan pembahagian. Eraman sel dalam tripsin-EDTA pada jangka masa yang panjang boleh mengurangkan pengepresan gen penanda pada permukaan sel stem dan juga viabiliti sel (Tsuji et al. 2017). SHED dan DPSC masing-masing diperolehi daripada gigi susu dan kekal. Sel yang berasal daripada sumber jenis gigi yang berlainan juga akan mempunyai keupayaan proliferasi dan pencirian molekul yang berbeza. Oleh itu, objektif kajian ini adalah untuk mengenal pasti pasaj serta pendekatan pengkulturan *in vitro* yang terbaik

bagi sel SHED dan DPSC. Pasaj sel yang menunjukkan masa penggandaan paling singkat digunakan dalam pencirian profil penanda molekul bagi pencirian sel stem mesenkima dan sel stem hematopoietik.

BAHAN DAN KAEDAH

PEMENCILAN DAN MORFOLOGI SHED DAN DPSC

Sampel gigi diperolehi daripada individu yang sihat dengan kebenaran bertulis serta mendapat kelulusan etika daripada Jawatankuasa Etika Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM 1.5.3.5/244/FST-2015-009). Gigi susu diperolehi daripada kanak-kanak berumur 3 hingga 12 tahun, manakala gigi kekal diambil daripada orang dewasa berumur 18 hingga 25 tahun. Sampel gigi dibersihkan dengan 1% (i/i) larutan penisilin-streptomisin (HiMedia, India) dalam salin berpenimbang fosfat (PBS) (Gibco, USA) dan dipotong pada *cemento-enamel junction* (CEJ) menggunakan *bur* pergigian. Tisu pulpa gigi seterusnya diekstrak, dicincang dan dicernakan di dalam 1 mg/mL kolagenase jenis I (500 CDU) (Sigma Aldrich, USA) selama 30 min pada 37°C. Kemudian, serum fetus lembu (FBS) (Gibco, USA) ditambahkan ke dalam campuran untuk merencatkan tindak balas enzim kolagenase sebelum diemparkan pada kelajuan 400 g selama 5 min. Supernatan dibuang manakala pelet diampai dalam medium lengkap yang mengandungi Dulbecco's Minimum Essential Medium-Knockout™ (Gibco, USA), 10% FBS, 1% (i/i) larutan penisilin-streptomisin dan GlutaMAX™ (Gibco, USA). Medium lengkap ditukar setiap tiga hari sehingga SHED dan DPSC mencapai 85-90% tahap konfluen. Morfologi sel diperhatikan di bawah mikroskop medan songsang pada hari ke-3, 16 dan 33. Selepas pengsubkulturan, morfologi sel daripada pasaj 1 hingga pasaj 5 diperhatikan dan turut diwarnakan dengan larutan Giemsa serta diperhatikan di bawah mikroskop.

MASA PENGGANDAAN POPULASI SEL DALAM PENENTUAN PASAJ PENGKULTURAN *IN VITRO*

Masa penggandaan populasi sel (PDT) ditentukan pada setiap pasaj iaitu melibatkan pasaj 1 hingga pasaj 5 bagi kedua-dua sel SHED dan DPSC. Sel dikulturkan secara triplikat pada 5×10^4 sel/cm² dan diaram semalaman. Medium lama dibuang sebelum sel ditanggalkan menggunakan tripsin-EDTA pada hari 0, 1, 2, 4, 6, 7, 9, 12, 15 dan 21. Bilangan sel viabel ditentukan menggunakan hemasitometer setelah diwarnakan dengan larutan tripan biru 0.4% (i/i) (Life Technologies, USA) pada nisbah 1:1. Lengkuh pertumbuhan kedua-dua sel bagi setiap pasaj dibina untuk menentukan titik permulaan dan akhir fasa pertumbuhan eksponen. Berdasarkan nilai kedua-dua titik ini, nilai PDT seterusnya ditentukan menggunakan formula berdasarkan Yazid et al. (2014) seperti berikut:

$$PDT = \frac{t \log 2}{\log NH - \log NI}$$

dengan t ialah masa yang diambil untuk mengganda; NH ialah bilangan sel yang diperolehi pada masa akhir; dan NI ialah bilangan sel yang diperolehi pada masa awal.

PENKULTURAN DAN KESAN TRIPSIN-EDTA PADA SHED DAN DPSC

Penentuan ketumpatan sel dan masa eraman optimum menggunakan Alamar biru ditentukan melalui ketumpatan sel yang berbeza iaitu pada 0.08×10^5 , 0.16×10^5 , 0.8×10^5 , 1.6×10^5 dan 3.2×10^5 sel/mL dengan masa eraman dalam larutan Alamar biru pada 0, 2, 4, 6 dan 24 jam. SHED dan DPSC pada pasaj optimum (pasaj 3) yang ditentukan melalui masa penggandaan populasi sel (PDT) yang paling rendah dikulturkan pada ketumpatan berbeza dan dieramkan semalaman untuk pelekatan sel sebelum eraman dalam larutan Alamar biru. Setelah sel dibilas beberapa kali dengan 1XPBS; sebanyak 20 μ L larutan Alamar biru (Sigma Aldrich, USA) ditambahkan ke dalam setiap telaga yang mengandungi sel pada ketumpatan yang berbeza. Nilai penyerapan pada panjang gelombang 570 dan 600 nm menggunakan spektrofotometer ditentukan bagi setiap ketumpatan sel selepas penambahan larutan Alamar biru pada 0, 2, 4, 6 dan 24 jam. Penentuan ketumpatan sel dan masa eraman yang optimum ditentukan melalui ketumpatan sel yang tertinggi dengan jangka masa eraman yang sesuai.

Ketumpatan sel dan masa eraman yang sesuai ini seterusnya digunakan untuk mengkulturkan sel bagi penentuan kesan tripsin-EDTA. Sebanyak 20 μ L tripsin-EDTA ditambah dan dieram pada 37°C selama 5, 10, 15, 30, 60 dan 90 min. Sel tanpa rawatan dan sel yang dieramkan dalam *Accutase*TM (HiMedia, India) masing-masing digunakan sebagai kawalan negatif dan positif.

PENENTUAN POTENSI PROLIFERASI SEL

SHED dan DPSC pada pasaj 3 digunakan dalam asai 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) bagi penentuan potensi proliferasi sel. Kedua-dua sel SHED dan DPSC dikulturkan pada 1.6×10^4 sel/mL dan dieramkan semalaman. Sejumlah 20 μ L larutan MTT 5 mg/

mL (Sigma Aldrich, USA) ditambahkan ke dalam medium lengkap yang telah dikulturkan selama 0, 3, 12 dan 21 hari. Setelah dieram selama 4 jam pada 37°C, nilai penyerapan ditentukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 dan 655 nm.

PENGEKSPRESAN PENANDA BIOLOGI SEL STEM

SHED dan DPSC pada pasaj 3 digunakan untuk menjalankan tindak balas rantaian polimerase-transkriptase berbalik (RT-PCR). Prosedur pengekstrakan RNA dilakukan menggunakan reagen TRIzol[®] (Life Technologies, USA) mengikut arahan pembekal. RT-PCR dua langkah yang dilakukan melibatkan 200 ng RNA digunakan untuk sintesis templat cDNA. Sebanyak 1 μ L templat cDNA digunakan untuk amplifikasi seterusnya dengan menggunakan kit PCR (Promega, USA) yang mempunyai kepekatan akhir komponen seperti berikut: 1 \times penimbal PCR, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 μ M pencetus ke hadapan dan ke belakang dan 1.25 U Taq polimerase. Jujukan pencetus bagi penanda molekul *GAPDH*, *cKIT*, *CD11b*, *CD29*, *CD34*, *CD45*, *CD73*, *CD105* dan *CD146* yang digunakan untuk amplifikasi dan pengenalpastian adalah berdasarkan Jadual 1.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Tisu pulpa gigi susu dan kekal merupakan sumber alternatif yang baik untuk pemencilan sel stem kerana sampel gigi selalunya akan dibuang selepas rawatan gigi. SHED dan DPSC boleh dipencilkan melalui teknik eksplan atau pencernaan enzim. Pencernaan menggunakan enzim kolagenase jenis I adalah lebih baik berbanding teknik eksplan kerana ia menyingkirkan kotoran dan cebisan kecil tisu sebelum pengkulturkan *in vitro*. Teknik ini juga telah menunjukkan potensi proliferasi dan pemineralan yang lebih tinggi sewaktu pembezaan osteoblas berbanding teknik eksplan (Karamzadeh et al. 2012; Yazid et al. 2018a).

Berdasarkan Rajah 1, SHED dan DPSC didapati melekat pada dasar kelalang kultur pada hari ke-3 dan seterusnya membentuk koloni kecil pada hari ke-16. Kedua-dua sel

JADUAL 1. Senarai pencetus yang digunakan untuk analisis biologi molekul

Gen	Pencetus ke hadapan (5' - 3')	Pencetus berbalik (5' - 3')	Suhu(°C)
<i>GAPDH</i>	GCAACTAGGATGGTGTGGCT	TCCCATCCCCAGCTCTCATA	59.5
<i>cKIT</i>	CTATCAGTTCAGCGAGAGTT	ACATTCAACCGTGCCATT	56.1
<i>CD11b</i>	TCTTGATTGATGGCTCTGGTAG	GGCTTGGATGCGATGGTATT	62.9
<i>CD29</i>	TGAGGAGGATTACTTCGGACTT	TTCTGGACAAGGTGAGCAATAG	62.9
<i>CD34</i>	CAAGTTAGTAGCCAACGAG	GCTTCAAGGTTGTCTCTGGAG	60.4
<i>CD45</i>	AACCGAATCTGACATCATCACC	AGCAGGCACAAGAAGGTAGG	61.0
<i>CD73</i>	TGATAATGGTGTGGAAGGACTG	TGCTTGGATCTTCAGGAATGC	60.0
<i>CD105</i>	CGGTGAAGGTGGAAGTGA	TTCCGCTGTGGTGTGATGAG	61.2
<i>CD146</i>	CCACCACACTTCAGCATCA	CACAAGACAGATTCAACACCAT	60.2

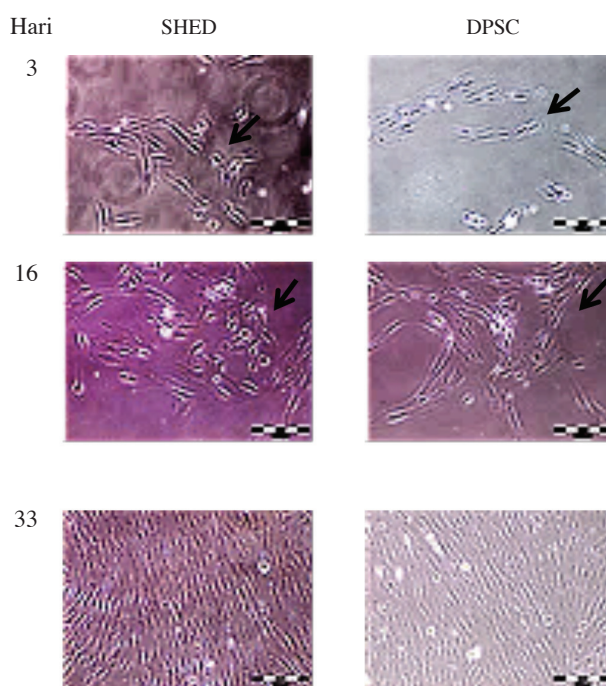
SHED dan DPSC didapati mempunyai bentuk yang seragam pada hari ke-3 dan ke-16 dengan ciri morfologi sel seperti 'spindle-like'. Kedua-dua sel didapati menyerupai sel fibroblas dan konfluen (85-90%) pada hari ke-33. Morfologi fibroblas ini diperhatikan wujud secara konsisten setelah konfluen bagi pasaj pertama hingga kelima (Rajah 2). Pewarnaan Giemsa bagi setiap pasaj menghasilkan nukleus berwarna ungu dengan morfologi nukleus sel berbentuk bulat dan tunggal. Manakala morfologi sitoplasma kedua-dua sel adalah jernih, memanjang dan mengelilingi struktur nukleus. Corak migrasi sel bagi setiap pasaj juga jelas iaitu secara sehala (Rajah 2).

Morfologi sel stem yang menyerupai fibroblas adalah bertujuan untuk memudahkan migrasi sel ke arah tisu yang cedera sama seperti sel fibroblas semasa memulihkan kecederaan tisu (Busra et al. 2018; Chowdhury et al. 2015; Hasmad et al. 2018; Idrus et al. 2014; Law et al. 2015; Shanmuganatha et al. 2018). Selain sel stem pulpa gigi daripada manusia, sel stem pulpa gigi mencit serta sel stem melekat darah periferi manusia dan mencit juga turut mempunyai morfologi menyerupai sel fibroblas (Ab Kadir et al. 2012a; Rohaya et al. 2017, Shahrul Hisham et al. 2016, 2010; Yazid et al. 2018b, 2011). Penambahan medium terkondisi yang dilakukan dalam beberapa kajian bagi memperbanyakkan bilangan sel juga didapati masih mengekalkan morfologi sel menyerupai sel fibroblas (Chowdhury et al. 2012; Rohaina et al. 2014).

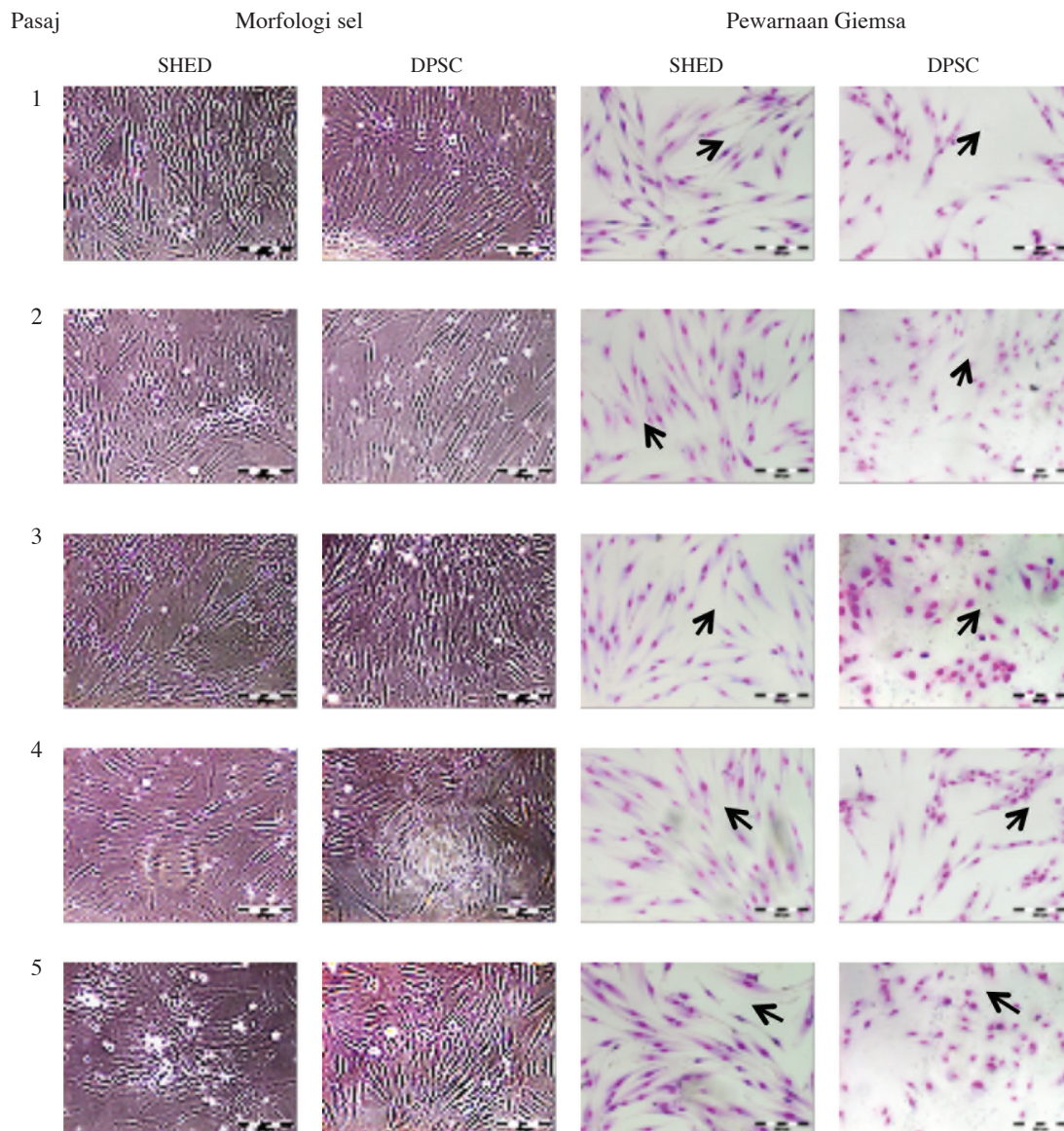
Sementara itu, lengkung pertumbuhan sel pada Rajah 3 menunjukkan wujudnya tiga fasa pertumbuhan sel yang utama iaitu fasa lag, log/eksponen dan pegun bagi SHED dan

DPSC. Lengkung pertumbuhan bagi pasaj 3 menunjukkan fasa lag yang lebih singkat atau lebih pendek berbanding pasaj 1, 2, 4 dan 5. Selain itu, pasaj 3 juga mencapai fasa pegun dengan lebih cepat iaitu pada hari ke-9. Oleh itu, pasaj 3 mempunyai lengkung pertumbuhan yang terbaik bagi kedua-dua SHED dan DPSC. Pada fasa lag, sel masih dalam keadaan pemulihan daripada kecederaan akibat penanggalan sel semasa eraman dengan tripsin-EDTA. Pada fasa ini, sel juga sedang mensintesis komponen penting sebagai persediaan untuk fasa seterusnya iaitu fasa log/eksponen. Pada fasa log/eksponen, proses proliferasi berlaku dan sel akan mendekati satu sama lain untuk memenuhi ruangan kosong pada permukaan kelalang kultur. Apabila jarak antara sel semakin dekat, akan berlakunya proses perencatan sentuhan antara sel yang akan merencat proses proliferasi sel dan seterusnya akan memasuki fasa pegun dengan mengekalkan bilangan sel viabel (Galle et al. 2009). Lengkung pertumbuhan sel dibina kerana lengkung ini penting dalam mengenal pasti titik permulaan dan titik penghujung fasa log/eksponen bagi penentuan nilai PDT.

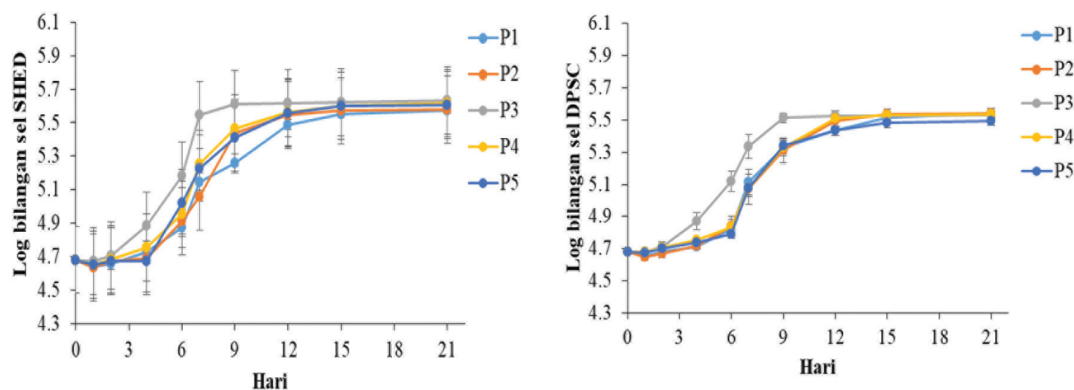
Berdasarkan Jadual 2, SHED dan DPSC pada pasaj 3 memberikan nilai PDT yang terendah yang menunjukkan masa penggandaan (PDT) yang paling singkat. Nilai PDT SHED dan DPSC pada pasaj 3 masing-masing adalah 43 ± 2.3 dan 63 ± 3.1 jam. Perbandingan antara pasaj mendapati sel SHED pada pasaj 3 menunjukkan penurunan nilai PDT yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding pasaj 1, 2, 4 dan 5. Bagi DPSC pula, PDT pasaj 3 didapati lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding pasaj 1 dan 2. Oleh kerana



RAJAH 1. Morfologi SHED dan DPSC selepas proses pemencilan pada hari ke-3, 16 dan 33. Anak panah mewakili pelekatan sel pada hari ke-3 dan pembentukan koloni sel pada hari ke-16. Pembesaran sebenar 100×



RAJAH 2. Morfologi SHED dan DPSC sewaktu pengsubkulturasi yang mewakili sel pada pasaj 1 hingga 5. Morfologi ditunjukkan adalah pemerhatian di bawah mikroskop medan songsang dan selepas pewarnaan Giemsa. Anak panah mewakili corak migrasi sel secara sehalu. Pembesaran sebenar 100x



RAJAH 3. Lengkuk pertumbuhan sel SHED dan DPSC pada pasaj 1 hingga 5. Min \pm sisihan piawai diperolehi daripada nilai triplikat bagi lima replikat biologi ($n=5$). Kedua-dua sel menunjukkan fasa lag diikuti dengan fasa log/eksponen dan seterusnya fasa pegun. Masa penggandaan sel (PDT) ditentukan berdasarkan fasa log/eksponen sahaja

JADUAL 2. Perbandingan masa penggandaan populasi sel (PDT) bagi SHED dan DPSC melibatkan sel pada pasaj 1 hingga 5

Pasaj	PDT (jam)	
	SHED	DPSC
1	97 ± 14.4*	123 ± 23.6 [#]
2	63 ± 12.0*	91 ± 10.4 [#]
3	43 ± 2.3	63 ± 3.1
4	86 ± 3.4*	89 ± 25.7
5	86 ± 7.1*	98 ± 15.6

Min ± sisihan piawai untuk triplikat bagi lima replikat biologi ($n=5$). Perbezaan statistik yang signifikan ($p<0.05$) antara pasaj bagi setiap sel dianalisis menggunakan ujian *Welch's ANOVA* beserta ujian *post-hoc Games-Howell*. *dan [#]masing-masing adalah berbeza secara signifikan antara pasaj bagi SHED dan DPSC antara pasaj 3 dengan pasaj-pasaj lain

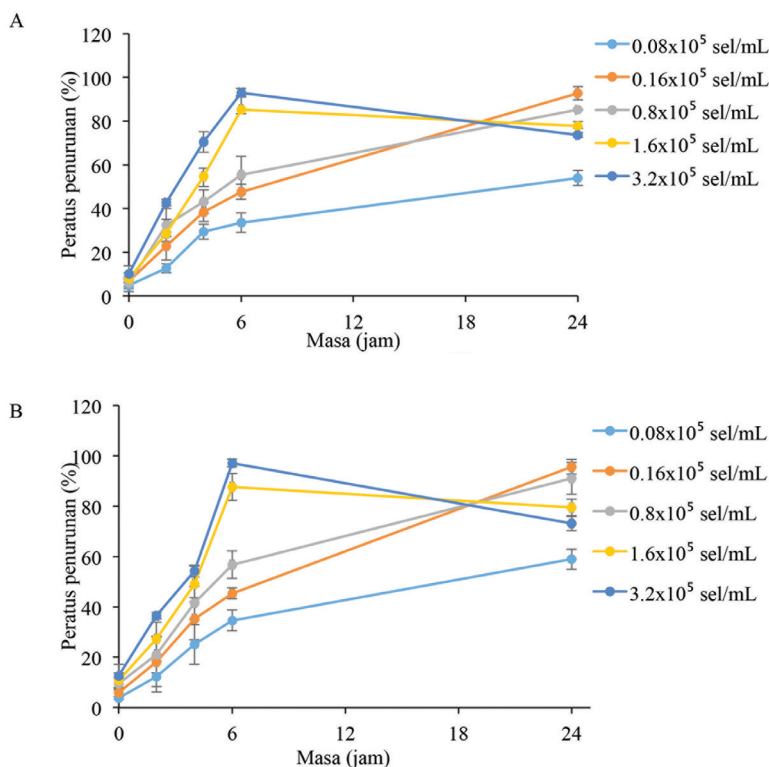
kedua-dua sel mengganda paling pantas pada pasaj 3 iaitu melalui nilai PDT paling rendah menjadikan sel pada pasaj 3 ini adalah pasaj yang paling sesuai untuk digunakan dalam analisis seterusnya.

Penggunaan enzim sel seperti tripsin-EDTA dalam pengkulturan sel secara *in vitro* tidak dapat dielakkan semasa pengsubkulturan. Tripsin-EDTA telah digunakan secara meluas dalam hampir kesemua penyelidikan sel stem untuk menanggalkan sel daripada permukaan kelalang kultur (Fong et al. 2017; Ting et al. 2015). Walau bagaimanapun, kajian oleh Tsuji et al. (2017) mendapati sel stem sinovia yang dieram dalam tripsin pada jangka masa yang panjang menunjukkan berlakunya pengurangan pengekspresan gen penanda dan viabiliti sel. Namun, bilangan sel stem neuron yang viabel adalah lebih rendah berbanding *Accutase*TM. Ini menunjukkan penggunaan enzim yang berlainan mempengaruhi keupayaan sesuatu sel yang dikultur secara *in vitro*. Oleh itu, kajian penentuan kesan tripsin-EDTA perlu dilakukan untuk mengetahui samada ia mempunyai kesan yang signifikan terhadap pengkulturan dan potensi sel SHED dan DPSC. Selain itu, penggunaan tripsin-EDTA dapat memastikan sel berada dalam bentuk ampaian sel tunggal bagi menentukan bilangan sel viabel dan seterusnya pengiraan masa penggandaan populasi sel (PDT) dapat dilakukan. Analisis kesan tripsin-EDTA ke atas SHED dan DPSC bermula dengan pengasaian Alamar biru. Ketumpatan sel dan masa eraman yang optimum adalah pada ketumpatan 0.16×10^5 sel/mL dan 0.8×10^5 sel/mL dengan eraman selama 24 jam serta ketumpatan 1.6×10^5 dan 3.2×10^5 sel/mL dengan 6 jam eraman bagi kedua-dua sel (Rajah 4). Ketumpatan sel 0.16×10^5 sel/mL bagi kedua-dua SHED dan DPSC dipilih untuk analisis seterusnya disebabkan mempunyai nilai ketumpatan terendah walaupun masa eramannya lebih lama (24 jam). Ini kerana bilangan sel stem yang diasingkan daripada tisu sentiasa sedikit disebabkan peratus populasi sel stem yang rendah pada tisu. Sel stem pada sumsum tulang didapati hanya terdiri daripada 0.01-0.05% daripada keseluruhan sel sumsum tulang (Intan Zarina et al. 2008; Shahrul Hisham et al. 2005).

Jadual 3 menunjukkan SHED yang dieram dengan tripsin-EDTA selama 5 hingga 15 min memberikan peratus sel viabel sebanyak 96-97%. DPSC pula menunjukkan

peratusan sel viabel yang lebih tinggi berbanding SHED iaitu sebanyak 98-99% walaupun jangka masa eraman adalah sama. Walau bagaimanapun, SHED dan DPSC yang dieramkan di dalam tripsin-EDTA selama 15 min tidak menunjukkan kesan penurunan sel viabel yang signifikan ($p>0.05$) berbanding sel kawalan negatif (Jadual 3). Manakala SHED dan DPSC dalam tripsin-EDTA bagi masa eraman 30 hingga 90 min menunjukkan penurunan viabiliti sel yang signifikan ($p<0.05$) berbanding sel kawalan negatif (Jadual 3; *nilai signifikan $p<0.05$). Apabila masa eraman sel dalam tripsin-EDTA dipanjangkan kepada 30 sehingga 90 min, SHED menunjukkan penurunan peratus sel viabel sehingga 81-90%. Peratus sel viabel bagi DPSC pada 30 kepada 90 min pula berada dalam julat 83-94%. Populasi sel viabel bagi SHED pula didapati lebih rendah secara signifikan ($p<0.05$) berbanding DPSC pada 30 dan 60 min dalam kehadiran tripsin-EDTA (Jadual 3; #nilai signifikan $p<0.05$). Bagi sel yang dieram dengan *Accutase*TM pula, kedua-dua SHED dan DPSC menunjukkan tiada perubahan yang signifikan ($p<0.05$) terhadap peratus sel viabel sehingga masa eraman 90 min apabila dibandingkan dengan sel kawalan negatif atau pun antara sel stem yang dianalisis (SHED dan DPSC).

*Accutase*TM merupakan campuran enzim protease dan kolagenase yang diperolehi daripada invertebrata. Tripsin-EDTA pula mengandungi campuran enzim protease yang diperolehi daripada pankreas mamalia (Salzig et al. 2013). Eraman sel dalam tripsin-EDTA pada jangka masa yang panjang didapati menyebabkan kerosakan pada sel mamalia seperti sel stem. Eraman sel stem neuron dalam tripsin-EDTA didapati boleh menyebabkan pengurangan bilangan sel viabel yang signifikan ($p<0.05$) berbanding eraman dalam *Accutase*TM (Ting et al. 2015). Bilangan sel viabel dan kelangsungan hidup sel stem neuron didapati menurun secara signifikan ($p<0.05$) apabila dieramkan dalam tripsin-EDTA selama 10 min (Wachs et al. 2003). Bilangan sel stem sumsum tulang yang viabel dieram dalam tripsin-EDTA selama 5 min turut didapati menurun secara signifikan ($p<0.05$) berbanding kawalan negatif (Fong et al. 2017). Kajian terhadap sel titisan normal dan kanser hati mendapati peratus sel viabel dalam tripsin-EDTA adalah sama berbanding sel kawalan negatif selepas



RAJAH 4. Lengkuh piawai asai Alamar biru bagi sel A) SHED dan B) DPSC pada pasaj 3. Min \pm sisihan piawai diperolehi daripada nilai triplikat bagi lima replikat biologi ($n=5$)

JADUAL 3. Kesan tripsin-EDTA terhadap viabiliti sel SHED dan DPSC pada masa eraman yang berbeza

Masa (minit)	Sel viabel (%)					
	Tripsin-EDTA		<i>Accutase</i> TM		Kawalan negatif	
	SHED	DPSC	SHED	DPSC	SHED	DPSC
5	97 \pm 1.9	99 \pm 0.6	99 \pm 0.9	99 \pm 0.4	100 \pm 0.7	100 \pm 0.3
10	97 \pm 1.9	99 \pm 0.5	99 \pm 0.3	99 \pm 0.2	99 \pm 0.3	99 \pm 0.3
15	96 \pm 2.2	98 \pm 0.7	99 \pm 0.3	99 \pm 0.5	100 \pm 1.3	99 \pm 0.9
30	90 \pm 3.8 [#]	94 \pm 1.3 [*]	98 \pm 1.1	98 \pm 1.4	99 \pm 0.4	99 \pm 0.1
60	85 \pm 2.8 [#]	89 \pm 2.2 [*]	97 \pm 2.0	97 \pm 2.3	99 \pm 0.9	100 \pm 0.9
90	81 \pm 2.8 [*]	83 \pm 2.1 [*]	96 \pm 2.1	96 \pm 3.0	100 \pm 0.7	100 \pm 0.8

Min \pm sisihan piawai diberikan bagi triplikat untuk lima replikat biologi ($n=5$). ^{*}mewakili perbezaan statistik yang signifikan ($p<0.05$) berdasarkan ujian-t bagi tripsin-EDTA dan *Accutase*TM berbanding kawalan negatif pada masa eraman masing-masing. [#]merupakan nilai signifikan ($p<0.05$) melalui ujian-t melibatkan perbandingan antara SHED dan DPSC pada masa eraman yang sama

10 min eraman (Wan Haifa Haryani et al. 2010). Namun, kesan tripsin-EDTA terhadap sel tersebut pada masa eraman melebihi 10 min adalah tidak diketahui (Fong et al. 2017; Wachs et al. 2003; Wan Haifa Haryani et al. 2013). Maka, penggunaan tripsin-EDTA menyebabkan penurunan sel stem yang viabel tetapi bilangan sel viabel bagi sel titisan tetap sama. Dalam kajian ini, peratus kedua-dua sel stem (SHED dan DPSC) yang viabel didapati tidak berubah secara signifikan ($p<0.05$) walaupun dieram dengan *Accutase*TM sehingga 90 min (Jadual 3). Walau bagaimanapun, peratus sel viabel didapati lebih rendah berbanding kawalan negatif iaitu sel stem tanpa rawatan. Walaupun sel viabel untuk SHED didapati menurun berbanding kawalan negatif tetapi perbandingan sel viabel antara SHED dan DPSC didapati

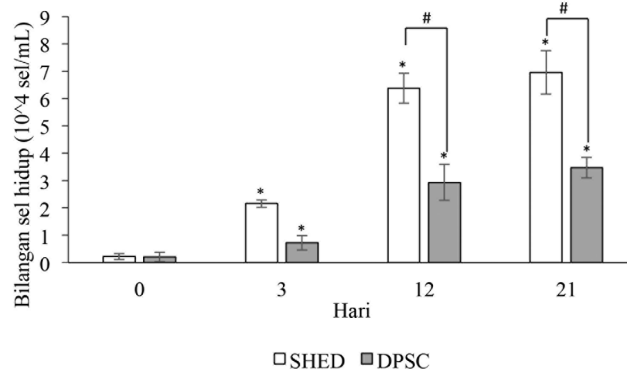
hampir sama pada masa eraman sehingga 15 min. Oleh itu, kedua-dua *Accutase*TM dan tripsin-EDTA adalah selamat dan tidak menunjukkan kesan negatif yang signifikan terhadap sel SHED dan DPSC jika dieramkan sehingga 15 min. Dalam kajian ini, proses menanggalkan sel hanya dilakukan selama 5 min, maka penggunaan tripsin-EDTA diteruskan untuk uji kaji seterusnya kerana tidak menyebabkan kesan negatif yang signifikan.

Sel stem berupaya membahagi secara infiniti dan menjadikannya unik berbanding sel lain. Rajah 5 menunjukkan kedua-dua sel (SHED dan DPSC) berproliferasi sehingga hari ke-21. Bilangan sel SHED dan DPSC didapati meningkat secara signifikan ($p<0.05$) pada hari ke-3, 12 dan 21 berbanding hari 0. Hal ini menunjukkan bahawa SHED

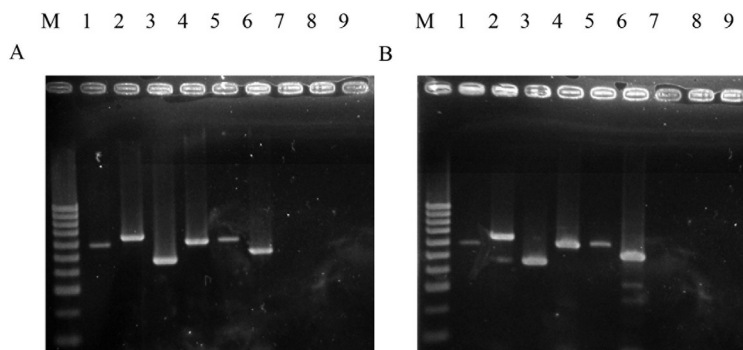
dan DPSC masing-masing mempunyai potensi berproliferasi apabila dikulturkan secara *in vitro* dalam medium lengkap. Apabila perbandingan potensi proliferasi antara kedua-dua jenis sel dilakukan, SHED menunjukkan peningkatan sel viabel yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding DPSC pada hari ke-12 dan 21. Bilangan sel SHED adalah ~2.3 kali ganda lebih tinggi berbanding sel DPSC pada hari ke-21 (Rajah 5). Kajian terdahulu juga melaporkan bahawa SHED mempunyai potensi proliferasi yang lebih tinggi daripada DPSC (Kunimatsu et al. 2018). Hal ini mungkin kerana SHED mengandungi subpopulasi sel stem multipoten yang kurang matang berbanding sumber sel stem gigi kekal kerana SHED diperolehi daripada gigi susu melibatkan kanak-kanak di bawah umur 12 tahun. Subpopulasi sel yang kurang matang kebiasaannya terdiri daripada sel primitif yang diketahui mempunyai potensi proliferasi yang lebih tinggi berbanding sel matang (Kanafi et al. 2013; Miura et al. 2003). Selain proliferasi, sel primitif juga mampu membeza kepada pelbagai jenis sel lain bergantung kepada tahap primitifnya (Intan Zarina et al. 2010; Shahrul Hisham et al. 2011, 2010, 2005).

Selain potensi proliferasi, sel stem juga mengekspreskan profil penanda permukaan sel yang unik. SHED (Rajah

6A) dan DPSC (Rajah 6B) didapati mengekspreskan gen penanda *GAPDH*⁺, *cKIT*⁺, *CD29*⁺, *CD73*⁺, *CD105*⁺ dan *CD146*⁺ tetapi tidak mengekspreskan *CD11b*⁻, *CD34*⁻ dan *CD45*⁻. Gen *GAPDH* merupakan kawalan positif kerana ia sentiasa diekspres sebagai gen penyelenggara sel oleh kesemua sel hidup. *cKIT* pula diekspreskan oleh semua jenis sel stem dan menjadi molekul perantara sewaktu proses kelangsungan hidup, proliferasi dan migrasi sel (Huang et al. 2014; Lennartsson & Ronnstrand 2012). *CD29* pula merupakan integrin $\beta 1$ yang membantu migrasi MSC ke arah tisu yang cedera (Ip et al. 2007). Corak migrasi sel stem dikawal oleh *CD73* dan dipengaruhi oleh faktor mekanik (Ode et al. 2011). Berikutan itu, *CD73* didapati menyokong ciri-ciri MSC untuk kebolehan membaik pulih sel dan ciri imunomodulatori sewaktu penyembuhan tisu yang cedera (Kirches et al. 2018; Monguio-Tortajada et al. 2017). *CD105* pula adalah endoglin yang bertindak sebagai reseptor bersama ‘transforming growth factor-beta’ (TGF- β) ketika sel mengalami pembezaan (Fan et al. 2016; Ishiy et al. 2018). *CD146* pula merupakan molekul pelekatan sel yang diekspreskan dengan tinggi oleh MSC semasa interaksi pelekatan sel kepada sel dan matriks (Sorrentino et al. 2008; Xu et al. 2009).



RAJAH 5. Penentuan potensi proliferasi sel SHED dan DPSC pada hari 0, 3, 12 dan 21. Min \pm sisihan piawai untuk triplikat bagi lima replikat biologi ($n=5$). *mewakili perbezaan statistik yang signifikan ($p < 0.05$) untuk semua hari analisis berbanding hari 0 berdasarkan ujian-t. #mewakili perbezaan statistik yang signifikan ($p < 0.05$) antara SHED dan DPSC pada hari yang sama



RAJAH 6. Pengekspresan penanda sel stem bagi A) SHED dan B) DPSC. Lajur M: Penanda 100 pb; 1: *GAPDH* (~582 pb); 2: *cKIT* (~647 pb); 3: *CD29* (~457 pb); 4: *CD73* (~599 pb); 5: *CD105* (~610 pb); 6: *CD146* (~523pb); 7: *CD11b* (~463 pb); 8: *CD34* (~589 pb) dan 9: *CD45* (~504 pb)

CD11b, *CD34* dan *CD45* pula penting untuk migrasi, pelekatan, fosforilasi dan proliferasi tetapi hanya pada sel stem hematopoietik (HSC) (Coughlin et al. 2015; Gounaris et al. 2007; Umemoto et al. 2012). Berdasarkan Ab Kadir et al. (2012b), sel stem darah periferi manusia jenis melekat juga mengekspreskan penanda biologi yang unik kepada sel stem mesenkima (MSC). Hasil analisis pengekspresan profil penanda molekul mendapati SHED dan DPSC merupakan MSC dan bukan HSC kerana kedua-dua sel hanya mengekspreskan penanda molekul MSC.

KESIMPULAN

Kedua-dua sel yang dikaji menunjukkan morfologi yang konsisten iaitu menyerupai sel fibroblas selepas lima kali pengsubkulturan (pasaj 1-5). Morfologi nukleusnya juga adalah konsisten iaitu tunggal dan berbentuk bulat serta sitoplasma jernih dan memanjang. Analisis PDT pada kedua-dua jenis sel stem menunjukkan bahawa pasaj 3 mengalami penggandaan sel dalam masa yang paling singkat. Pendedahan SHED dan DPSC kepada tripsin-EDTA mendapati DPSC adalah lebih stabil berbanding SHED. SHED mengalami penurunan peratus sel viabel secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding DPSC pada 30 dan 60 min eraman. Walau bagaimanapun, tiada perbezaan yang signifikan ditunjukkan terhadap sel viabel pada SHED berbanding DPSC serta sel kawalan negatif sehingga 15 min masa eraman. Ini menunjukkan bahawa pengsubkulturan sel-sel ini masih boleh menggunakan rawatan tripsin-EDTA pada eraman tidak melebihi 15 min. Kedua-dua sel berupaya berproliferasi dalam keadaan *in vitro* dengan SHED mempunyai potensi proliferasi yang lebih tinggi berbanding DPSC. Pengekspresan penanda sel stem pula mendapati kedua-dua jenis sel ini merupakan sel stem mesenkima dengan kehadiran penanda molekul *cKIT*⁺, *CD29*⁺, *CD73*⁺, *CD105*⁺, *CD146*⁺, *CD11b*, *CD34* dan *CD45*. Hasil kajian menunjukkan SHED dan DPSC pada pasaj 3 berpotensi untuk digunakan dalam kajian pembezaan bagi membentuk pelbagai jenis sel matang terutamanya daripada asalan yang sama seperti sel osteoblas dan kondrosit. Hasil yang bakal diperoleh boleh diaplikasikan dalam terapi sel bagi menggantikan sel yang rosak atau tidak sihat.

PENGHARGAAN

Penghargaan diberikan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia untuk geran penyelidikan (GUP-2017-054) dan Kementerian Pendidikan Malaysia (FRGS/1/2015/SG05/UKM/02/2) untuk pembiayaan kewangan kajian ini.

RUJUKAN

- Ab Kadir, R., Zainal Ariffin, S.H., Megat Abdul Wahab, R., Kermani, S. & Senafi, S. 2012a. Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *The Scientific World Journal* 2012: 843843.
- Ab Kadir, R., Zainal Ariffin, S.H., Megat Abdul Wahab, R. & Senafi, S. 2012b. Molecular characterisation of human

- peripheral blood stem cells. *South African Journal of Science* 108(5-6): 67-73.
- Busra, F.M., Lokanathan, Y., Nadzir, M.M., Saim, A., Idrus, R.B.H. & Chowdhury, S.R. 2018. Attachment, proliferation and morphological properties of human dermal fibroblasts on ovine tendon collagen scaffolds: A comparative study. *The Malaysian Journal of Medical Sciences* 24(2): 33-43.
- Chowdhury, S.R., Aminuddin, B.S. & Ruszymah, I. 2012. Effect of supplementation of dermal fibroblasts conditioned medium on expansion of keratinocytes through enhancing attachment. *Indian Journal of Experimental Biology* 50(5): 332-339.
- Chowdhury, S.R., Izzah, A.G., Manira, M., Lokanathan, Y., Aminuddin, B.S. & Ruszymah, I. 2015. Dermal fibroblast conditioned medium for skin wound healing. *Tissue Engineering Part A* 21(S1): S158.
- Coughlin, S., Noviski, M., Mueller, J.L., Chuwonpad, A., Raschke, W.C., Weiss, A. & Zikherman, J. 2015. An extracatalytic function of CD45 in B cells is mediated by CD22. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 112(47): E6515-E6524.
- Fan, W., Li, J., Wang, Y., Pan, J., Li, S., Zhu, L., Guo, C. & Yan, Z. 2016. CD105 promotes chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells through Smad2 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 474(2): 338-344.
- Farges, J.C., Keller, J.F., Carrouel, F., Durand, S.H., Romeas, A., Bleicher, F., Lebecque, S. & Staquet, M.J. 2009. Odontoblasts in the dental pulp immune response. *Journal of Experimental Zoology, Part B, Molecular and Developmental Evolution* 312(5): 425-436.
- Fong, D., Nicholas, D. & Hoemann, C.D. 2017. Mesenchymal stem cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for *in vitro* chemotaxis and adhesion assays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 484(3): 656-661.
- Galle, J., Preziosi, L. & Tosin, A. 2009. Contact inhibition of growth described using multiphase model and an individual cell based model. *Applied Mathematics Letters* 22(10): 1483-1490.
- Gounaris, E., Erdman, S.E., Restaino, C., Gurish, M.F., Friend, D.S., Gounari, F., Lee, D.M., Zhang, G., Glickman, J.N., Shin, K., Rao, V.P., Poutahidis, T., Weissleder, R., McNagny, K.M. & Khazaie, K. 2007. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104(50): 19977-19982.
- Grayson, W.L., Bunnell, B.A., Martin, E., Frazier, T., Hung, B.P. & Gimble, J.M. 2015. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews Endocrinology* 11(3): 140-150.
- Hasmad, H., Yusof, M.R., Mohd Razi, Z.R., Hj. Idrus, R.B. & Chowdhury, S.R. 2018. Human amniotic membrane with aligned electrospun fiber as scaffold for aligned tissue regeneration. *Tissue Engineering Part C Methods* 24(6): 368-378.
- Huang, Z., Ruan, H.B., Xian, L., Chen, W., Jiang, S., Song, A., Wang, Q., Shi, P., Gu, X. & Gao, X. 2014. The stem cell factor/kit signalling pathway regulates mitochondrial function and energy expenditure. *Nature Communications* 5: Article No. 4282.
- Idrus, R., Rameli, M.A., Low, K.C., Law, J.X., Chua, K.H., Abdul Latiff, M. & Saim, A. 2014. Full-thickness skin wound healing using autologous keratinocytes and dermal fibroblasts

- with fibrin: Bilayered versus single-layered substitute. *Advances in Skin and Wound Care* 27(4): 171-180.
- Intan Zarina, Z.A., Shahrul Hisham, Z.A., Zaidah, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2010. Keupayaan pembezaan tiga jenis sel primitif daripada hasil perbezaan tempoh proliferasi darah mencit. *Sains Malaysiana* 39(2): 305-313.
- Intan Zarina, Z.A., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Sahidan, S. & Zaidah, Z.A. 2008. Osteoclast and osteoblast development of *Mus musculus* haemopoietic mononucleated cells. *Journal of Biological Sciences* 8(3): 506-516.
- Ip, J.E., Wu, Y.J., Huang, J., Zhang, L., Pratt, R.E. & Dzau, V.J. 2007. Mesenchymal stem cells use integrin $\beta 1$ not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Molecular Biology of the Cell* 18(8): 2873-2882.
- Ishiy, F.A.A., Fanganiello, R.D., Kobayashi, G.S., Kague, E., Kuriki, P.S. & Passos-Bueno, M.R. 2018. CD105 is regulated by hsa-miR-1287 and its expression is inversely correlated with osteopotential in SHED. *Bone* 106: 112-120.
- Jeon, M., Song, J.S., Choi, B.J., Shin, D.M., Jung, H.S. & Kim, S.O. 2014. *In vitro* and *in vivo* characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. *Archives of Oral Biology* 59(10): 1013-1023.
- Kanafi, M.M., Pal, R. & Gupta, P.K. 2013. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells. *Cell Biology International* 37(2): 126-136.
- Karamzadeh, R., Eslaminejad, M.B. & Aflatoonian, R. 2012. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *Journal of Visual Experiments: JoVE* 69: 4372.
- Kirches, E., Steffen, T., Waldt, N., Hebert, E., Pachow, D., Wilisch-Neumann, A., Keilhof, G., Schneider, T., Braunsdorf, W.E.K., Warnke, J.P. & Mawrin, C. 2018. The expression of the MSC-marker CD73 and of NF2/Merlin are correlated in meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology* 138(2): 251-259.
- Kunimatsu, R., Nakajima, K., Awada, T., Tsuka, Y., Abe, T., Ando, K., Hiraki, T., Kimura, A. & Tanimoto, K. 2018. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 501(1): 193-198.
- Law, J.X., Chowdhury, S.R., Saim, A. & Idrus, R. 2015. Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cytotherapy* 17(3): 293-300.
- Lennartsson, J. & Ronnstrand, L. 2012. Stem cell factor receptor/c-Kit: From basic science to clinical implications. *Physiological Reviews* 92(4): 1619-1649.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G. & Shi, S. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100(10): 5807-5812.
- Monguio-Tortajada, M., Roura, S., Galvez-Monton, C., Franquesa, M., Bayes-Genis, A. & Borrás, F.E. 2017. Mesenchymal stem cells induce expression of CD73 in human monocytes *in vitro* and in a swine model of myocardial infarction *in vivo*. *Frontiers in Immunology* 8: 1577.
- Ode, A., Kopf, J., Kurtz, A., Schmidt-Bleek, K., Schrade, P., Kolar, P., Buttgerit, F., Lehmann, K., Huttmacher, D.W., Duda, G.N. & Kasper, G. 2011. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *European Cell Material* 22: 26-42.
- Rohaina, C.M., Yogeswaran, L., Rabiatal Adawiyah, R., Chowdhury, S.R., Aminuddin, B.S. & Ruszymah, H.I. 2014. The effect of nasal fibroblast conditioned medium on *in vitro* wound healing model. *Regenerative Research* 3(2): 87-88.
- Rohaya, M.A.W., Nur Akmal, M.R., Sahidan, S., Intan Zarina, Z.A., Zaidah, Z.A. & Shahrul Hisham, Z.A. 2017. Impact of isolation method on doubling time and the quality of chondrocyte and osteoblast differentiated from murine dental pulp stem cells. *PeerJ* 5: e3180.
- Salzig, D., Schmiermund, A., Grace, P.P., Elseberg, C., Weber, C. & Czermak, P. 2013. Enzymatic detachment of therapeutic mesenchymal stromal cells grown on glass carriers in a bioreactor. *The Open Biomedical Engineering Journal* 7: 147-158.
- Shahrul Hisham, Z.A., Rus Dina, R.D., Zulham, Y., Ikmal, M.J., Sahidan, S. & Rohaya, M.A.W. 2017. Penyerapan akar gigi apeks luaran hasil rawatan ortodontik pada enam dan 12 bulan. *Sains Malaysiana* 46(8): 1299-1307.
- Shahrul Hisham, Z.A., Thanaleetchumi, M., Intan Zarina, Z.A., Sahidan, S. & Rohaya, M.A.W. 2016. Isolation and morphology of stem cells from deciduous tooth (SHED) and human dental pulp stem cell (hDPSC). *AIP Conference Proceedings* 1784 2016: 020008.
- Shahrul Hisham, Z.A., Zulham, Y., Intan Zarina, Z.A., Rohaya, M.A.W. & Zaidah, Z.A. 2011. Cellular and molecular changes in orthodontic tooth movement. *The Scientific World Journal* 11(1): 1-16.
- Shahrul Hisham, Z.A., Intan Zarina, Z.A., Muhamad Dain, Y. & Rohaya, M.A.W. 2010. Differentiation analyses of adult suspension mononucleated peripheral blood cells of *Mus musculus*. *Cell Communication and Signaling* 8: 29. doi: 10.1186/1478-811X-8-29.
- Shahrul-Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Ismanizan, I., Nor-Muhammad, M. & Zaidah, Z.A. 2005. Stem cells, cytokines and their receptors. *Asia Pacific Journal Molecular Biology and Biotechnology* 13(1): 1-13.
- Souza, L.M., Bittar, J.D., Silva, I.C.R., Toledo, O.A., Brigido, M.M. & Pocas-Fonseca, M.J. 2015. Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Brazilian Journal of Oral Science* 9(4): 427-433.
- Sorrentino, A., Ferracin, M., Castelli, G., Biffoni, M., Tomaselli, G., Baiocchi, M., Fatica, A., Negrini, M., Peschle, C. & Valtieri, M. 2008. Isolation and characterization of CD146⁺ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology* 36(8): 1035-1046.
- Ting, L., Chen, L., Zhang, C. & Zhao, J. 2015. Effect of accutase or trypsin dissociation on the apoptosis of human striatum-derived neural stem cells. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* 37(2): 185-194.
- Tsuji, K., Ojima, M., Otabe, K., Horie, M., Koga, H., Sekiya, I. & Muneta, T. 2017. Effects of different cell-detaching methods on the viability and cell surface antigen expression of synovial mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation* 26(6): 1089-1102.
- Umemoto, T., Yamato, M., Ishihara, J., Shiratsuchi, Y., Utsumi, M., Morita, Y., Tsukui, H., Terasawa, M., Shibata, T., Nishida, K., Kobayashi, Y., Petrich, B.G., Nakauchi, H., Eto, K. & Okane, T. 2012. Integrin- α v β 3 regulates

- thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 119(1): 83-94.
- Shanmuganatha, L., Azmi, B., Abdul, H.A.R., Nor Hazla, M.H., Sabaru, A.M., Ruszymah, B.H.I., Chowdhury, S.R., Roslinda, S., Abu, B.S. & Angela, N.H.M. 2018. Role of titanium-wollastonite in promoting mesenchymal stem cells growth. *Regenerative Research* 7(1): 28.
- Wachs, F., Couillard-Despres, S., Engelhardt, M., Wilhelm, D., Ploetz, S., Vroemen, M., Kaesbauer, J., Uyanik, G., Klucken, J., Karl, C., Tebbing, J., Svendsen, C., Weidner, N., Kuhn, H., Winkler, J. & Aigner, L. 2003. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. *Laboratory Investigation* 83(7): 949-962.
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.X., Eckstein, V., Boukamp, P. & Ho, A.D. 2009. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS ONE* 4(6): p. e5846.
- Wan Haifa Haryani, W.O., Shahrul Hisham, Z.A., Zaidah, Z.A., Muhd Fauzi, S., Sahidan, S. & Rohaya, M.A.W. 2010. Anticancer screening of ethanol extract from selected piperaceae family and its determination via trypan blue staining. *Sains Malaysiana* 39(6): 941-949.
- Xu, J., Wang, W., Kapila, Y., Lotz, J. & Kapila, S. 2009. Multiple differentiation capacity of STRO-1⁺/CD146⁺ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Development* 18(3): 487-496.
- Yazid, F., Luchman, N.A., Wahab, R.M.A., Ariffin, S.H.Z. & Senafi, S. 2018a. Proliferation and osteoblast differentiation mice dental pulp stem cells between enzyme digestion and outgrowth method. *Sains Malaysiana* 47(4): 649-656.
- Yazid, F., Ng, A.N.M.N., Wong, Y.Q., Luchman, N.A., Zainal Ariffin, S.H. & Megat Abdul Wahab, R. 2018b. Osteogenic performance of MC3T3-E1 cells on granular hydroxyapatite scaffold. *Asian Journal of Medicine and Biomedicine* 3: OP20.
- Yazid, M.D., Shahrul Hisham, Z.A., Sahidan, S., Zaidah, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2011. Stem cell heterogeneity of mononucleated cells from murine peripheral blood: Molecular analysis. *The Scientific World Journal* 2011(11): 2150-2159.
- Yazid, F., Gnanasegaran, N., Kunasekaran, W., Govindasamy, V. & Musa, S. 2014. Comparison of immunomodulatory properties of dental pulp stem cells derived from healthy and inflamed teeth. *Clinical Oral Investigation* 18(9): 2103-2112.
- Shahrul Hisham Zainal Ariffin* & Thanaletchumi Manogaran
Pusat Bioteknologi dan Makanan Berfungsi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia
- Intan Zarina Zainol Abidin
Centre for Research and Postgraduate Studies
Cyberjaya University College of Medical Sciences
63000 Cyberjaya, Selangor Darul Ehsan
Malaysia
- Zaidah Zainal Ariffin
Pusat Pengajian Biologi
Fakulti Sains Gunaan
Universiti Teknologi MARA
40450 UiTM Shah Alam, Selangor Darul Ehsan
Malaysia
- Rohaya Megat Abdul Wahab
Unit Ortodontik
Pusat Kesihatan Pergigian Keluarga
Fakulti Pergigian
Universiti Kebangsaan Malaysia
50300 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: hisham@ukm.edu.my

Diserahkan: 25 Februari 2019

Diterima: 25 Jun 2019