

TESIS

KARAKTERISASI STABILITAS FISIKA, BOKIMIA DAN MIKROBIOLOGI
FREEZE-DRIED SECRETOME DARI CHONDROGENIC ADIPOSE
MESENCHYMAL STEM CELL (AdMSC)



Oleh:

Ferdiansyah Danang P.
011618126301

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022

TESIS

KARAKTERISASI STABILITAS FISIKA, BOKIMIA DAN MIKROBIOLOGI
FREEZE-DRIED SECRETOME DARI CHONDROGENIC ADIPOSE
MESENCHYMAL STEM CELL (AdMSC)

Oleh:

Ferdiansyah Danang P.
011618126301

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022

TESIS

**KARAKTERISASI STABILITAS FISIKA, BOKIMIA DAN MIKROBIOLOGI
*FREEZE-DRIED SECRETOME DARI CHONDROGENIC ADIPOSE
MESENCHYMAL STEM CELL (AdMSC)***

Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik
Pada Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Ferdiansyah Danang P.
011618126301

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Ferdiansyah Danang P, dr.
NIM : 011618126301
Program Studi : Ilmu Kedokteran Klinik / Orthopaedi dan Traumatologi
Judul Tesis : KARAKTERISASI STABILITAS FISIKA, BIODINAMIKA DAN MIKROBIOLOGI *FREEZE-DRIED SECRETOME* DARI *CHONDROGENIC ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELL (AdMSC)*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis penulis ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiarism) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik. Tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan di dalam daftar pustaka.

Demikian pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak manapun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 14 April 2022



Ferdiansyah Danang P, dr.

NIM. 011618126301

HALAMAN PERSETUJUAN PENELITIAN TESIS

TESIS INI TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 14 April 2022

**Oleh
Pembimbing Ketua**



Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., Sp.OT(K)
NIP. 19641115 199003 1 001

Pembimbing Kedua



Dr. Lukas Widhiyanto, dr., Sp.OT(K)
NIP. 19740723 200801 1 009

**Mengetahui,
Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**



Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp.A(K)
NIP. 19650227 199003 1 010

HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI

Tesis penelitian ini diajukan oleh:

Nama : Ferdiansyah Danang P, dr.

NIM : 011618126301

Program Studi : Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga

Judul : **KARAKTERISASI STABILITAS FISIKA, BOKIMIA
DAN MIKROBIOLOGI *FREEZE-DRIED SECRETOME*
DARI *CHONDROGENIC ADIPOSE MESENCHYMAL STEM
CELL (AdMSC)***

Tesis ini diuji dan dinilai pada oleh panitia penguji

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Pada tanggal : 14 April 2022

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Heri Suroto, dr., Sp.OT(K)

Anggota

1. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr, Sp.OT(K)
2. Dr. Lukas Widhiyanto, dr., Sp.OT(K)
3. Teddy Heri Wardhana, dr., SpOT(K)
4. Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes

RINGKASAN

Karakterisasi Stabilitas Fisika, Biokimia dan Mikrobiologi *Freeze-Dried Cartilage Secretome Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC)*

Ferdiansyah Danang P.

Cedera pada kartilago adalah sebuah masalah serius bagi pasien karena kartilago adalah sebuah struktur avaskular, alimfatik dan aneural sehingga cedera pada kartilago sulit untuk sembuh dan semakin mendekatkan pasien kepada problem osteoarthritis. Pilihan terapi untuk cedera kartilago sebenarnya cukup variatif, namun saat ini belum ada yang dapat menjanjikan kesembuhan optimal bagi pasien. Salah satu alternatif terapi pada cedera kartilago adalah dengan menggunakan adjuvant berupa sekretom. Sekretom adalah protein yang disekresikan oleh sel, jaringan atau organisme ke ekstraseluler pada waktu dan kondisi tertentu. Selain protein sekretom juga mengandung asam nukleat, lemak dan vesikel ekstraseluler (Daneshmandi *et al.*, 2020; Hathout, 2007). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombinasi sekretom dan scaffold memiliki potensi yang baik untuk regenerasi kartilago dengan cara meningkatkan ekspresi kolagen tipe 2 seperti pada kartilago hialin yang banyak terdapat pada kartilago sendi (Perbowo *et al.*, 2020). Sekretom harus disimpan dan di transport dengan baik agar tidak merusak sekretom tersebut. Salah satu pilihan metode penyimpanan sekretom adalah dengan metode *freeze-dried*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas fisika, biokimia dan mikrobiologi *Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC)*. Penelitian ini dilakukan dengan metode prospektif analitik observasional. *Freeze-dried secretome* dari *chondrogenic* AdMSC dilakukan analisis stabilitas fisika (perubahan organoleptik (bentuk, warna dan bau), pH, biokimia (TGF- β 3), dan mikrobiologi (kontaminasi kuman). Semua perubahan pada stabilitas dilakukan observasi pada minggu 0, 4, 8 dan 12. Normalitas dan homogenitas data diuji dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk dan diikuti dengan uji Friedman dan selanjutnya dilakukan uji komparasi dengan metode Wilcoxon. Hasil dari stabilitas organoleptik menunjukkan tidak ada perubahan warna sampai minggu ke – 4 serta tidak ada perubahan bentuk dan bau sampai minggu ke – 12. Tidak ada perubahan pH selama 12 minggu. Kadar TGF- β 3 yang memiliki peran dalam proses kondrogenesis menunjukkan tidak ada penurunan secara signifikan hingga 12 minggu. Serta tidak ada kontaminasi kuman yang ditemukan hingga minggu ke – 12.

SUMMARY

Physiobiochemistry and Microbiologic Stability Characteristics of Freeze-Dried Secretome from Chondrogenic Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC)

Ferdiansyah Danang P.

Cartilage injury is a serious problem for the patients because of its avascular, alymphatics, and aneural structure, so it is difficult to heal properly and bring the patient one step closer to osteoarthritis. Treatment options for cartilage injuries are varied, but currently, no one can promise optimal healing for patients. One alternative therapy for cartilage injuries is to use a secretome as an adjuvant. Secretomes are proteins secreted by cells, tissues, or organisms into the extracellular space at certain times and under certain conditions. In addition to protein, the secretome also contains nucleic acids, fats, and extracellular vesicles (Daneshmandi *et al.*, 2020). Previous studies have shown that the combination of secretome and scaffold has good potential for cartilage regeneration by increasing the expression of type 2 collagen as in hyaline cartilage, which is abundant in joint cartilage (Perbowo *et al.*, 2020). The freeze-drying method is one method to store the secretome. This study aims to determine the physical, biochemical, and microbiological stability of one of the freeze-dried secretomes derived from the Chondrogenic Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC). This research was conducted with a prospective observational analytic method. Freeze-dried chondrogenic secretome from AdMSC was analyzed for physical stability (organoleptic changes (shape, color, and odor)), pH, biochemical (TGF- β 3), and microbiological (bacteria contamination) analysis. All changes in instability were observed at weeks 0, 4, 8, and 12. The data's normality and homogeneity were tested using the Shapiro-Wilk test, followed by the Friedman test, then compared using the Wilcoxon method. The organoleptic changes showed no color changes until the 4th week, with no changes in shape and odor until the 12th week. No changes in pH after 12 weeks. TGF- β 3, which has a role in the chondrogenesis process, showed no significant decrease until twelve weeks. Moreover, no contamination were found until week 12.

ABSTRAK

Karakterisasi Stabilitas Fisika, Biokimia dan Mikrobiologi *Freeze-Dried Secretome* dari *Chondrogenic Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC)*

Ferdiansyah Danang Perwira¹, Dwikora Novembri Utomo¹, Lukas Widhiyanto¹

Departemen Orthopaedi dan Traumatologi, RSUD Dr. Soetomo/ Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Latar Belakang: Cedera pada kartilago sendi adalah masalah serius karena kartilago sendiri adalah sebuah struktur avaskular, alimfatik dan aneural sehingga kartilago sulit untuk dapat sembuh seperti sebelum cedera. Salah satu alternatif terapi terbaru adalah dengan menggunakan sekretom. Sekretom sendiri haruslah disimpan dan di transport dengan baik agar tidak merusak sekretom tersebut. Salah satu metode penyimpanan adalah dengan metode *freeze-drying*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas fisika, biokimia dan mikrobiologi dari salah satu sekretom yaitu sekretom yang bersifat chondrogenic dari *Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC)*

Metode: Penelitian ini adalah penelitian prospektif analitik observasional. *Freeze-dried secretome* dari *Chondrogenic AdMSC* dilakukan analisis stabilitas fisika (perubahan organoleptik (bentuk, warna dan bau), pH dan perubahan morfologi), biokimia (TGF- β 3), dan mikrobiologi (kontaminasi kuman). Semua perubahan dilakukan observasi pada minggu 0, 4, 8 dan 12. Normalitas dan homogenitas data diuji dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk dan diikuti dengan uji Friedman dan uji Wilcoxon untuk analisa data.

Hasil: Perubahan organoleptik tidak menunjukkan perubahan warna sampai minggu ke – 4 dengan tidak adanya perubahan dari bentuk dan bau sampai minggu ke – 12. Tidak ada perubahan signifikan pada perubahan morfologi serta tidak ada perubahan pH. TGF- β 3 yang memiliki peran dalam proses kondrogenesis menunjukkan tidak ada penurunan secara signifikan hingga minggu ke – 12 serta tidak ada kuman yang ditemukan hingga minggu ke - 12

Kesimpulan: Penelitian ini menunjukkan bahwa tidak didapatkan perubahan warna hingga minggu ke – 4 serta tidak didapatkan perubahan morfologi secara signifikan. Tidak ada perubahan kadar pH, kadar TGF- β 3 dan tidak ada pertumbuhan kuman hingga minggu ke-12.

Kata Kunci: *freeze-dried*, secretome, *AdMSC*

ABSTRACT

Physiobiochemical and Microbiologic Stability Characteristics of Freeze-Dried Cartilage Secretome Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC)

Ferdiansyah Danang Perwira¹, Dwikora Novembri Utomo¹, Lukas Widhiyanto¹

¹Orthopaedic and Traumatology Department, Dr. Soetomo General Hospital/
Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

Introduction: Cartilage is an avascular, alymphatics, and aneural structure, so it is difficult to heal properly. One of the latest alternatives of treatment is using a secretome. However, secretome is needed to store appropriately. Freeze-drying is one of the methods to choose because of its advantage. This study aims to characterize the physical, biochemistry, and microbiology stability of Freeze-Dried Secretome derived from Chondrogenic Adipose Mesenchymal Stem Cell (AdMSC).

Methods: This study is prospective observational analytics research. Freeze-dried cartilage secretome AdMSC was analyzed for physical (organoleptic changes (shape, color, and smells), pH, and morphologic change), biochemistry (TGF- β 3), and microbiology (microbe contamination) stability. The change was observed in 0, 4, 8, and 12 weeks. Data normality and homogeneity were tested using the Shapiro-Wilk test and followed up with the Friedman test and Wilcoxon test to further analyze the data.

Results: Organoleptics change showed no color change until four weeks with no change of shape and smell until 12 weeks. No significant difference was found in porosity and pH change—TGF- β 3, which has a role in chondrogenesis, has no significant decrease until 12 weeks. No contamination was found until 12 weeks.

Conclusion: This study showed no color change until the fourth week, and no significant morphological changes were obtained until twelve weeks. There was no significant change in pH, TGF- β 3 levels, and no contamination until the twelfth week.

Keywords: freeze-dried, secretome, AdMSC

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM.....	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSETUJUAN	v
HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat teoritis	5
1.4.2 Manfaat praktis.....	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	 6
2.1 Cedera pada Kartilago.....	6
2.1.1 Proses penyembuhan pada kartilago sendi.....	7
2.1.2 Pilihan terapi pada cedera kartilago	8
2.2 MSC sebagai Salah Satu Pilihan Terapi pada Cedera Kartilago.....	15
2.2.1 <i>Adipose-Derived Mesenchymal Stem cell (AdMSC)</i>	17
2.2.2 AdMSC pada proses penyembuhan kartilago	18
2.2.3 <i>Adipose Derived Cartilage Secretome</i>	18
2.2.4 Teknik kultur <i>Mesenchymal Stem cell (MSC)</i>	19
2.2.5 Biomaterial <i>scaffold</i>	27
2.3 Proses Penyimpanan dan Pengawetan Sekretom	28
2.3.1 <i>Lyophilization</i> atau pengawetan beku kering.....	29
2.3.2 Cryopreservasi.....	31
2.4 Uji Karakteristik pada Sekretom	32
2.4.1 Karakteristik fisik sekretom	32
2.4.2 Karakteristik biokimia sekretom	32
2.4.3 Karakteristik mikrobiologi sekretom	35

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	37
3.1 Kerangka Konseptual	37
3.1.1 Penjelasan kerangka konsep	38
3.1.2 Hipotesis	39
BAB 4 METODE PENELITIAN	40
4.1 Jenis Penelitian	40
4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel Penelitian	41
4.2.1 Variabel bebas	41
4.2.2 Variabel terikat	41
4.2.3 Definisi operasional variabel	42
4.3 Alur Penelitian	43
4.4 Alat dan Bahan Penelitian	43
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	46
4.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	46
4.7 Cara Pengelolaan dan Analisis Data	46
4.7.1 Uji karakteristik stabilitas fisik	46
4.7.2 Uji karakteristik stabilitas biokimia	47
4.7.3 Uji karakteristik stabilitas mikrobiologi	47
BAB 5 HASIL PENELITIAN	48
5.1 Hasil Penelitian	48
5.1.1 Hasil evaluasi stabilitas fisik (bentuk, warna dan bau)	48
5.1.2 Hasil evaluasi stabilitas pH	50
5.1.3 Hasil evaluasi stabilitas biokimia	50
5.1.4 Hasil evaluasi stabilitas mikrobiologi	52
BAB 6 PEMBAHASAN	53
6.1 Hasil Pengamatan Karakterisasi Stabilitas Fisika	54
6.2 Hasil Pengamatan Karakterisasi Stabilitas Biokimia	55
6.3 Hasil Pengamatan Karakterisasi Stabilitas Mikrobiologi	56
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	57
7.1 Kesimpulan	57
7.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Ringkasan perbedaan kultur sel 2D dan 3D	23
Tabel 4.1 Definisi operasional variabel	42
Tabel 5.1 Hasil pengamatan organoleptis	48
Tabel 5.2 pH <i>freeze-dried chondrogenic secretome AdMSC</i>	50
Tabel 5.3 Konsentrasi TGF- β 3 pada <i>freeze-dried chondrogenic secretome AdMSC</i> (ng/l)	50
Tabel 5.4 Tabel uji komparasi TGF- β 3 menggunakan metode Wilcoxon <i>post hoc</i>	51
Tabel 5.5 Rata - rata dan standar deviasi kadar TGF- β 3 <i>freeze-dried chondrogenic secretome (AdMSC)</i>	50
Tabel 5.6 Tabel uji komparasi antar minggu kadar TGF- β 3 dengan metode Wilcoxon	51
Tabel 5.7 Hasil evaluasi stabilitas mikrobiologi pada <i>Freeze-Dried Chondrogenic Secretome AdMSC</i>	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Skema dasar kartilago artikular.....	7
Gambar 2.2 Konsep dasar articular cartilage implantation.....	10
Gambar 2.3 Potensi diferensiasi MSC untuk memperbaiki berbagai jenis kerusakan jaringan	17
Gambar 2.4 Metode kultur sel 3D tanpa scaffold	23
Gambar 3.1 Kerangka konseptual.....	37
Gambar 4.1 Rancangan penelitian	40
Gambar 4.2 Alur penelitian.....	43
Gambar 5.1 Perubahan warna dan bentuk <i>freeze-dried secretome</i> dari <i>chondrogenic</i> AdMSC	49

DAFTAR SINGKATAN

AdMSC	<i>Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell</i>
ACI	<i>Autologous Chondrocyte Implantation</i>
ADSC	<i>Adipose Tissue-derived Stem Cell</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BMSCs	<i>Bone Marrow Stromal Cells</i>
CRT	<i>Cathode Ray Tube</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HA	<i>Hyaluronic Acid</i>
IFP	<i>Infrapatellar Fat Pad</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
OA	<i>Osteoarthritis</i>
OCA	<i>Osteochondral Allograft</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PMMA	<i>Polymethyl Methacrylate</i>
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i>
SMCs	<i>Skin Derived Mesenchymal Stem Cells</i>
SVF	<i>Stromal Vascular Fraction</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>