

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Pengobatan Luka dalam Konteks Militer

Prajurit di medan tempur sering mengalami berbagai cedera, seperti luka tembak, luka bakar, trauma ledakan, dan luka benda tajam, yang dapat merusak jaringan lunak hingga organ dalam (Smith et al., 2021). Kondisi luka yang kompleks dan progresivitas kerusakan jaringan pada prajurit membutuhkan penanganan cepat dan efektif untuk mencegah komplikasi lebih lanjut. Proses penyembuhan luka terdiri dari tahap hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling sering kali terhambat oleh infeksi serta keterbatasan akses perawatan medis. Hal ini meningkatkan risiko pembentukan jaringan parut dan nekrosis (Widgerow et al., 2019). Banyak korban di medan tempur meninggal sebelum menerima perawatan medis lengkap karena penanganan yang terbatas di lapangan (Kotwal et al., 2016).

Menurut data *Department of Defense Trauma Registry* (DODTR) 2007–2020, dari 28.950 kasus pra-rumah sakit, mayoritas cedera disebabkan oleh ledakan (52,1%) dan senjata api (28,1%), dengan evakuasi udara digunakan dalam 77,9% kasus (Schauer et al., 2021). Kondisi lingkungan ekstrem, seperti panas tinggi dan medan yang sulit, dapat memperburuk cedera dan memperlambat proses penyembuhan (Mabry et al., 2015). Risiko komplikasi dan kematian dapat dikurangi dengan solusi medis yang cepat dan stabil dalam perawatan segera di lapangan.

Mesenchymal stem cells (MSCs) atau sel punca mesenkimal telah muncul sebagai opsi terapi inovatif untuk mempercepat penyembuhan luka. MSCs bekerja dengan menekan peradangan dan merangsang pembentukan pembuluh darah baru melalui sekresi VEGF (Maranda et al., 2017; Rehman et al., 2004). Sekretom MSC, yang mengandung

berbagai faktor bioaktif seperti sitokin, faktor pertumbuhan, dan protein anti-inflamasi, yang dapat mempercepat regenerasi jaringan, mengurangi inflamasi, dan mencegah kematian sel (Riis et al., 2017). Dalam fase remodeling, sekretom membantu menyusun ulang dan memperkuat matriks ekstraseluler (ECM), memastikan pemulihan jaringan yang optimal dan mencegah kerusakan lebih lanjut (Hyldig et al., 2017).

Sekretom MSC memiliki peran penting sebagai solusi *wound healing* karena memiliki manfaat dalam mempercepat penyembuhan, terutama di kondisi darurat dengan risiko infeksi tinggi. Aplikasi krioprotektan seperti trehalosa dapat meningkatkan stabilitas dan efektivitas sekretom, memungkinkan penggunaannya di medan tempur. Hal ini akan mendukung ketersediaan solusi medis yang efektif dan mempercepat pemulihan korban.

2.1.2 Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat Manusia (MSCs-hUC)

Mesenchymal stem cells (MSCs) atau sel punca mesenkim termasuk sel punca dewasa yang dapat diisolasi dari jaringan dewasa maupun fetus. MSCs dari jaringan dewasa dapat diisolasi dari sumsum tulang, gigi, darah perifer, dan jaringan lemak, sedangkan dari jaringan fetus dapat diisolasi dari membrane amnion, plasenta, darah tali pusat dan Wharton's Jelly tali pusat (Noviantari & Khariri, 2022).

MSCs harus memiliki tiga kriteria menurut *Mesenchymal and Tissue stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*. Pertama, sel mampu melekat pada dasar wadah kultur plastik (*plastic-adherent*) dalam medium kultur standar. Kriteria kedua adalah sel mampu mengekspresikan marker CD105, CD73, CD90 dan tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79alpha atau HLA-DR pada permukaan sel. Kriteria ketiga adalah sel punca mesenkim dapat berdiferensiasi menjadi jaringan adiposit, kondroblas, dan osteoblas secara *in vitro* (Noviantari & Khariri, 2022).

MSCs memiliki sifat regenerative yang luas dan imunomodulator yang dapat digunakan dalam perbaikan jaringan dan penyembuhan luka. MSCs juga dapat bermigrasi ke tempat inflamasi, lokasi jaringan yang mengalami cedera, infeksi, dan tumor dengan imunomodulasi lingkungan mikro melalui kontak sel ke sel dan pelepasan faktor terlarut sehingga memfasilitasi adanya perbaikan pada jaringan yang rusak serta merespon kemokin, sitokin, dan faktor pertumbuhan. Beberapa hasil penelitian klinis yang dilakukan menunjukkan bahwa MSCs memiliki potensi dalam pengembangan sistem penghantaran obat berbasis sel, yang dapat membantu dalam terapi penyakit glioblastoma, gangguan pendengaran sensorineural, kanker kolektoral, epilepsi, stroke, iskemik, dan *Intervertebral Disc Degeneration* (IDD). Namun, perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut untuk mengoptimalkan sistem tersebut (Suparno et al., 2022).

2.1.3 Sekretom Tali Pusat Manusia (SM-hUC)

Sekretom merupakan kumpulan molekul bioaktif yang disekresikan oleh sel, seperti protein, lipid, metabolit, serta asam nukleat termasuk RNA dan mikroRNA (miRNA). Komponen-komponen ini memainkan peranan penting dalam berbagai proses biologis, seperti regenerasi jaringan, modulasi imun, dan penyembuhan luka. Oleh karena itu, kestabilan molekul-molekul dalam sekretom sangat penting untuk dipertahankan, terutama dalam pengembangan aplikasi terapeutik, termasuk pada kondisi kritis seperti trauma militer dan luka kronis. Salah satu tantangan utama dalam pemanfaatan sekretom sebagai agen terapi adalah bagaimana menjaga bioaktivitas komponen-komponen utamanya selama proses penyimpanan dan pengawetan, khususnya pada proses liofilisasi (freeze-drying).

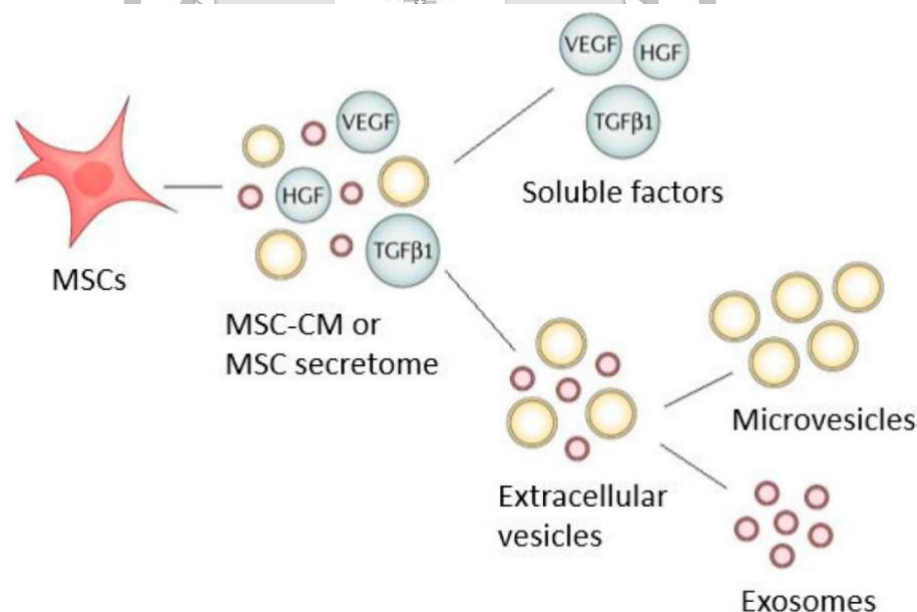
Protein dalam sekretom merupakan komponen utama yang memediasi efek terapeutik melalui aktivitas enzimatis, pengiriman sinyal antar sel, dan stimulasi proliferasi serta migrasi sel. Protein seperti faktor

pertumbuhan (misalnya TGF- β , VEGF, dan FGF) sangat rentan terhadap degradasi, denaturasi, dan agregasi akibat perubahan suhu, pH, atau stres fisik selama proses pengeringan dan penyimpanan (Gambar 2.1). Kerusakan pada struktur sekunder atau tersier protein dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas biologisnya. Pada proses liofilisasi, perubahan suhu ekstrem dan hilangnya air struktural dapat merusak ikatan hidrogen yang menjaga struktur protein. Oleh karena itu, diperlukan zat pelindung seperti trehalosa yang mampu menggantikan peran air dan membentuk matriks kaca (vitrikifikasi) yang menjaga struktur dan fungsi protein selama dan setelah proses pengeringan (Starciuc et al., 2020; Kommineni et al., 2022).

Selain protein, RNA dan mikroRNA (miRNA) dalam sekretom juga berperan penting sebagai molekul pengatur yang dapat memodulasi ekspresi gen pada sel target. MiRNA berfungsi melalui pengikatan spesifik terhadap mRNA target untuk menghambat translasi atau mempercepat degradasi mRNA tersebut. Fungsi ini menjadikan miRNA sebagai kandidat bioaktif potensial dalam berbagai terapi, termasuk penyembuhan luka dan perbaikan jaringan. Namun, miRNA sangat rentan terhadap degradasi oleh enzim RNase yang umum terdapat di lingkungan sekitar. Selain itu, ketidakstabilan akibat fluktuasi suhu, pH, atau kondisi fisik selama proses liofilisasi dapat menyebabkan fragmentasi atau kehilangan fungsi miRNA. Perlindungan terhadap miRNA dilakukan secara alami melalui pengikatan dalam kompleks protein, seperti Argonaute 2 (AGO2), atau pembungkusan dalam vesikel seperti eksosom. Kompleks ini membantu mempertahankan stabilitas miRNA selama transportasi antar sel. Jika protein pelindung ini terdenaturasi selama proses pengeringan, maka miRNA menjadi rentan terhadap degradasi dan kehilangan aktivitas biologisnya (Gaur et al., 2022; Karunnamithy et al., 2024).

Kestabilan protein dan miRNA dalam sekretom bersifat saling mendukung. Kerusakan salah satu komponen dapat berdampak

langsung pada efikasi sekretom secara keseluruhan. Dalam konteks aplikatif, terutama pada terapi medis di kondisi darurat atau medan militer, sekretom yang kehilangan stabilitas tidak hanya akan kehilangan fungsinya, tetapi juga berpotensi menimbulkan respons imun yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, strategi preservasi sekretom, seperti penggunaan trehalosa dalam proses liofilisasi, menjadi sangat penting untuk memastikan stabilitas dan bioaktivitas sekretom tetap terjaga selama penyimpanan, distribusi, dan aplikasi klinis (Kim et al., 2025; Li et al., 2022). Upaya ini merupakan langkah krusial untuk memastikan efektivitas terapi berbasis sekretom dapat diterapkan secara luas dan berkelanjutan.



Gambar 2.1 Kandungan Bioaktif Sekretom

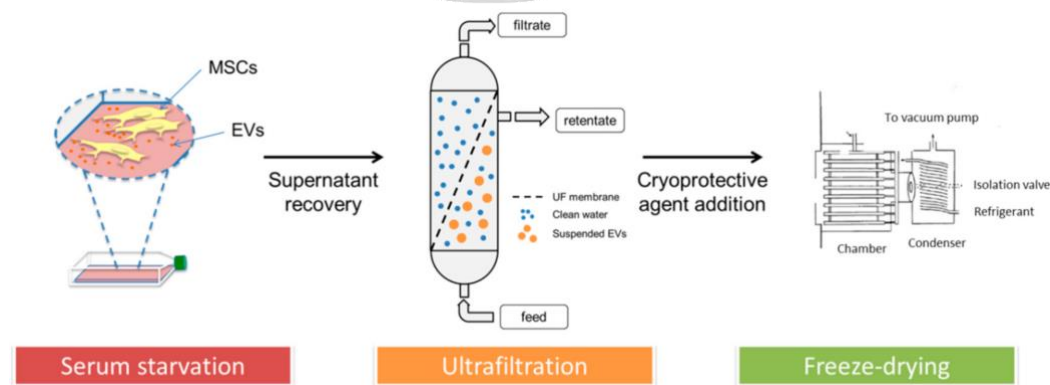
Sumber: Chouaib et al., 2023

2.1.4 Freeze-drying

Freeze-drying, atau liofilisasi, adalah metode pengawetan yang menjaga struktur dan aktivitas biomolekul seperti protein, enzim, dan sekretom untuk penggunaan jangka panjang. Proses ini terdiri dari tiga tahap utama yaitu tahap pembekuan (freezing), pengeringan primer

(primary drying), dan pengeringan sekunder. Trehalosa sebagai krioprotektan memainkan peran penting dalam melindungi biomolekul dari kerusakan selama proses ini. Tahap pertama bertujuan membekukan air dalam sampel menjadi es; tahap kedua melibatkan sublimasi es menjadi uap di bawah tekanan rendah; sementara tahap ketiga menghilangkan air yang tersisa dalam bentuk terikat (bound water) agar produk menjadi benar-benar kering (Park, 2019) (Gambar 2.2).

Proses ini tidak lepas dari tantangan. Selama pembekuan, pembentukan kristal es yang tajam dapat merusak struktur protein dan membra. Proses sublimasi menyebabkan peningkatan konsentrasi lokal solut yang dapat menyebabkan tekanan osmotik, perubahan pH mikro dan stres oksidatif. Akibatnya, protein rentan mengalami denaturasi, agregasi, atau bahkan kehilangan total aktivitas biologisnya (Kommineni et al., 2022; Li et al., 2022). Kerusakan ini sangat merugikan terutama pada sekretom yang mengandung molekul-molekul aktif penting seperti protein bioaktif, RNA, dan miRNA. Oleh karena itu, diperlukan strategi tambahan untuk menjaga kestabilan biomolekul selama proses *freeze-drying*.



Gambar 2.2 Proses Pembuatan Sekretom Freeze-Dried

Sumber: Bari et al., 2018

2.1.5 Krioprotektan

Krioprotektan merupakan senyawa yang ditambahkan ke dalam formulasi biologis untuk melindungi struktur dan fungsi biomolekul selama

proses pembekuan dan pengeringan. Zat ini berfungsi mengurangi efek kerusakan akibat pembentukan kristal es dan fluktuasi lingkungan mikro yang terjadi selama freeze-drying. Secara umum, krioprotektan dibedakan menjadi dua jenis, yaitu *permeating cryoprotectants* (seperti DMSO dan gliserol) yang dapat menembus membran sel, dan *non-permeating cryoprotectants* (seperti sukrosa, manitol, dan trehalosa) yang bekerja dari luar struktur biologis.

Dalam konteks sekretom, krioprotektan tidak hanya diperlukan untuk menjaga struktur protein, tetapi juga molekul RNA dan miRNA yang sangat sensitif terhadap perubahan suhu dan pH. Stabilitas protein sekretom penting untuk mempertahankan fungsi bioaktif seperti regenerasi jaringan dan imunomodulasi. Sementara itu, kestabilan RNA dan miRNA penting karena molekul-molekul ini berperan dalam regulasi ekspresi gen pada sel target penerima, serta mendukung efek parakrin sekretom. Tanpa perlindungan yang memadai, RNA dapat mengalami degradasi oleh RNase atau kerusakan struktural akibat suhu ekstrem, sehingga mengurangi efektivitas terapeutik sekretom (Gaur et al., 2022; Starciuc et al., 2020).

Oleh karena itu, penggunaan krioprotektan menjadi sangat krusial dalam memastikan biomolekul dalam sekretom tetap aktif, stabil, dan aman untuk digunakan dalam aplikasi klinis. Salah satu krioprotektan yang paling banyak diteliti dan digunakan dalam konteks ini adalah trehalosa.

2.1.5.1 Trehalosa Sebagai Krioprotektan

Trehalosa adalah disakarida non-reduksi yang terdiri dari dua molekul glukosa yang terhubung melalui ikatan α,α -1,1-glikosidik. Karakteristik kimianya yang stabil, tidak mudah terdegradasi, serta memiliki kemampuan dalam membentuk struktur amorf menjadikan trehalosa sangat efektif sebagai krioprotektan. Trehalosa bekerja melalui dua mekanisme utama: penggantian air (*water replacement*) dan vitrifikasi (*vitrification*).

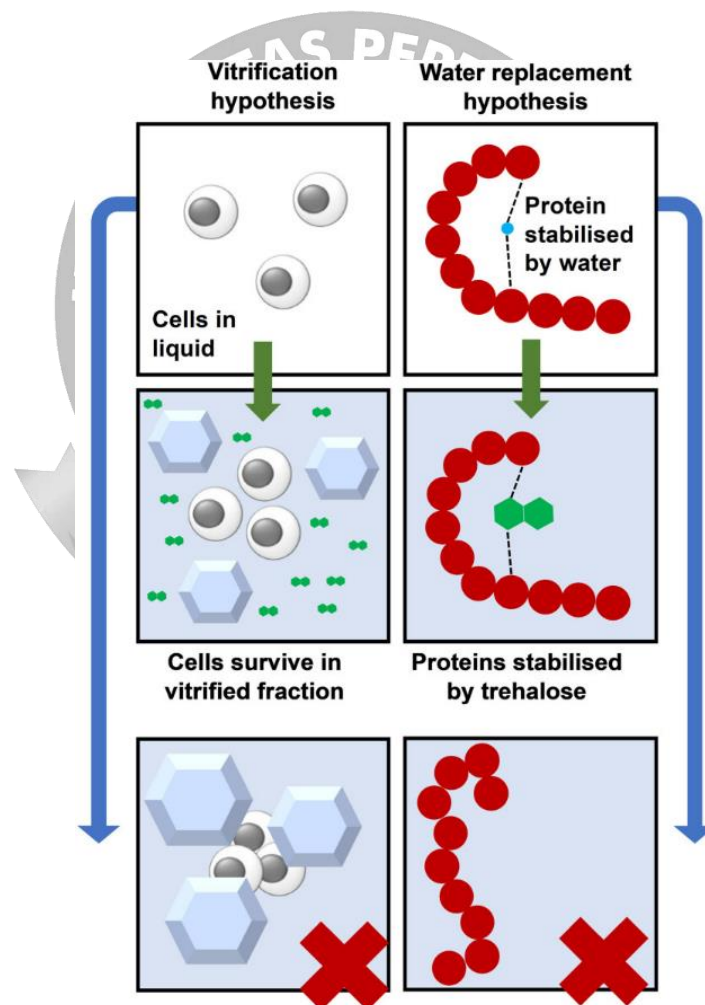
Pada mekanisme penggantian air, trehalosa menggantikan molekul air yang biasanya membentuk ikatan hidrogen dengan gugus polar pada

permukaan protein. Selama proses pengeringan, molekul air menguap dan hilang dari sistem; namun kehadiran trehalosa memungkinkan terbentuknya ikatan hidrogen baru antara trehalosa dan protein, yang membantu menjaga konformasi sekunder dan tersier protein tetap stabil (Camisasca et al., 2020; Ahlgren et al., 2023). Selain itu, ikatan ini juga memperkuat kestabilan struktural protein selama penyimpanan.

Sementara itu, pada mekanisme vitrifikasi, trehalosa mengalami transisi menjadi matriks kaca amorf (*vitrified glass*) saat larutan dibekukan dan dikeringkan. Matriks ini bersifat sangat viskoelastik dan dapat membatasi pergerakan molekul di dalamnya, sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya reaksi degradasi dan agregasi protein. Trehalosa juga diketahui dapat meningkatkan suhu transisi kaca (*glass transition temperature*, T_g), memungkinkan matriks vitrified tetap stabil pada suhu ruang maupun suhu penyimpanan dingin (Starciuc et al., 2020; Vallaster et al., 2024). Selain itu, trehalosa mampu menekan pembentukan kristal es besar yang bersifat merusak, menjadikannya pelindung ideal dalam proses freeze-drying (Connolly et al., 2015).

Meskipun demikian, efektivitas trehalosa sebagai krioprotektan sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor penting. Konsentrasi trehalosa harus dioptimalkan secara cermat. Konsentrasi yang terlalu rendah tidak memberikan perlindungan memadai terhadap biomolekul, sementara konsentrasi yang terlalu tinggi justru dapat menyebabkan kristalisasi trehalosa, yang merugikan stabilitas protein dan RNA (Karunnanithy et al., 2024). Selain itu, kadar air residual dalam produk akhir juga harus dijaga rendah agar tidak menurunkan T_g , yang dapat memicu degradasi selama penyimpanan. Suhu penyimpanan juga harus dipertimbangkan dengan hati-hati untuk menjaga kestabilan matriks vitrified.

Secara keseluruhan, trehalosa telah terbukti menjadi krioprotektan yang efektif dan aman dalam menjaga kestabilan protein, RNA, dan miRNA dalam sekretom. Optimalisasi penggunaannya dalam proses freeze-drying sangat penting dalam pengembangan produk sekretom yang stabil untuk aplikasi terapeutik, termasuk dalam penanganan luka dan trauma pada kondisi ekstrem seperti di lingkungan militer (Kim et al., 2025; Murray et al., 2024).



Gambar 2. 3 Mekanisme Protektif Trehalosa terhadap Protein Selama *Freeze-Drying*: Water Replacement dan Vitrifikasi

Sumber: Murray et al., 202

2.1.6 Kestabilan Protein Pasca *Freeze-drying*

Kestabilan protein dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa aktivitas biologis komponen bioaktif tetap terjaga saat proses *freeze-drying*. Stabilitas protein dari sekretome perlu diperhatikan dalam masa penyimpanan jangka panjang setelah proses *freeze drying*. Penambahan krioprotektan digunakan untuk melindungi zat bioaktif yang terkandung dalam sekretom agar tidak rusak ketika melalui proses *freeze drying* berlangsung. Penggunaan zat krioprotektan yang tidak tepat dapat mengubah struktur protein, komponen bioaktif dan fungsi yang terkandung di dalam sekretom pada proses *freeze drying* (Vinciguerrra et al., 2022).

Pengujian kestabilan protein dilakukan dengan menganalisis perubahan pH setelah proses rehidrasi yang dilakukan pada sekretom *freeze dried*, mengevaluasi integritas struktur protein menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan mendeteksi perubahan dalam spektrum absorbansi yang menunjukkan potensi denaturasi atau agregasi protein pada saat proses *freeze drying*, serta mengidentifikasi dan menganalisis komponen bioaktif seperti enzim dan protein yang terkandung dalam sekretom menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Crowe et al., 1998).

2.1.6.1 Analisis pH

Analisis pH setelah *freeze-drying* sangat penting dalam mengevaluasi stabilitas produk, terutama ketika menggunakan krioprotektan seperti trehalosa. Proses *freeze drying* mengakibatkan kandungan air dalam sekretom dihilangkan secara signifikan, yang dapat mempengaruhi pH produk karena terjadinya reaksi kimia selama pengeringan. Setelah *freeze drying*, sekretom harus melalui proses rehidrasi untuk mengembalikan komponen biologis ke kondisi aktifnya (Butreddy et al., 2020). pH yang optimal berkisar antara 7,4 – 7,6. pH tersebut mendekati pH fisiologis yang membantu menjaga stabilitas protein dan mengurangi kemungkinan denaturasi atau degradasi komponen

bioaktif selama penyimpanan dan rehidrasi.

Trehalosa berperan penting dalam melindungi protein dan struktur membrane sel dengan cara mencegah pembentukan kristal es selama proses pembekuan. Selain itu, trehalosa membantu mempertahankan struktur protein dan integritas komponen bioaktif, seperti enzim dan faktor pertumbuhan, agar tetap stabil dan berfungsi setelah rehidrasi. Penggunaan trehalosa memastikan komponen-komponen sensitif tetap utuh pada SC-hUC, memungkinkan sekretom untuk menjalankan fungsi biologisnya dengan optimal setelah proses pengeringan dan rehidrasi (Ohtake & Wang, 2011).

Proses liofilisasi dikenal dapat menyebabkan kerusakan struktural pada protein, terutama ketika tidak dilindungi oleh cryoprotectant. Pada kondisi kering dan suhu rendah, protein menjadi rentan mengalami deaminasi non-enzimatik, terutama pada residu glutamin (Gln) dan asparagin (Asn), yang akan melepaskan gugus amina (NH_2) dan membentuk amonia (NH_3) (Robinson & Robinson, 2001).

Amonia merupakan senyawa basa lemah yang berperan besar dalam peningkatan pH ketika larutan sekretom direhidrasi. Semakin banyak molekul protein yang mengalami deaminasi atau kerusakan struktural, maka semakin tinggi pula jumlah NH_3 yang dilepaskan ke dalam larutan, menyebabkan pH meningkat (Franks, 1998; Liu et al., 2020).

Protein yang terdapat dalam sekretom umbilical cord umumnya memiliki berat molekul rendah hingga menengah (sekitar 5–40 kDa), seperti *growth factors* (misalnya VEGF, FGF), sitokin, dan enzim proteolitik (Kim et al., 2020). Protein dengan ukuran kecil ini lebih rentan mengalami denaturasi, oksidasi, dan fragmentasi selama proses liofilisasi (Allison et al., 1999). Kerusakan protein akibat proses ini akan menghasilkan fragmen peptida dan gugus amina bebas, yang ketika larut kembali akan menghasilkan lingkungan basa (Zhou et al., 2019). Oleh karena itu, berat molekul rendah pada sekretom membuatnya lebih sensitif terhadap stres liofilisasi, dan berkontribusi pada kenaikan pH pasca-reaktivasi.

Trehalosa dikenal sebagai krioprotektan non-reduksi yang mampu melindungi struktur protein melalui mekanisme *water replacement* dan vitrifikasi, yang membantu mempertahankan struktur tiga dimensi protein selama proses pembekuan dan pengeringan (Crowe et al., 1992; Franks, 1998). Namun, efektivitas proteksi sangat dipengaruhi oleh konsentrasi trehalosa yang digunakan.

2.1.6.2 Analisis Integritas Struktur Protein

Analisis integritas struktur protein penting untuk memastikan bahwa protein bioaktif dalam sekretom tali pusat manusia tetap berfungsi setelah proses *freeze-drying* dan rehidrasi. Protein bioaktif, seperti faktor pertumbuhan dan sitokin, sangat sensitif terhadap perubahan struktural. Selama *freeze drying*. Proses dehidrasi dapat menyebabkan denaturasi atau agregasi protein yang mengurangi aktivitas biologisnya. Oleh karena itu, menjaga struktur tersier dan kuartier protein sangat penting agar fungsinya tidak terganggu secara signifikan.

Trehalosa, sebagai krioprotektan, efektif melindungi protein selama *freeze-drying* dengan membentuk lapisan pelindung di sekitar molekul protein dan menggantikan air dalam ikatan hidrogen. Hal ini mencegah denaturasi dan menjaga stabilitas membrane saat suhu rendah dan dalam kondisi dehidrasi (Chaudhuri et al., 2023). Selama rehidrasi, protein yang terlindungi oleh trehalosa dapat kembali ke bentuk aktifnya, memastikan integritas komponen bioaktif tetap utuh dan berfungsi.

Spektrofotometri UV-vis digunakan untuk menganalisis integritas struktur protein. Perubahan spektrum, seperti pergeseran puncak atau penurunan intensitas absorbansi, menandakan denaturasi atau agregasi. Sebaliknya, jika struktur protein tetap utuh, spektrum UV-Vis akan konsisten dengan kondisi sebelum *freeze-drying*, tanpa perubahan yang signifikan dalam intensitas maupun Lokasi puncak serapan (Devineau et al., 2017).

Penggunaan trehalosa sebagai krioprotektan, sekretom tali pusat manusia diharapkan mampu mempertahankan integritas dan fungsi protein

bioaktif. Perlindungan ini penting agar sekretom tetap memberikan efek biologis, seperti regenerasi jaringan atau peningkatan penyembuhan luka, setelah proses pengeringan dan rehidrasi.

2.1.6.3 Analisis Komponen Bioaktif

Analisis komponen bioaktif dalam SM-hUC *freeze-dried* menggunakan ELISA dilakukan untuk mendeteksi keberadaan protein TGF- β 1 dalam sekretom tali pusat manusia setelah proses freeze drying dan rehidrasi. Metode ini berbasis reaksi antigen-antibodi yang sangat spesifik, sehingga mampu mengidentifikasi protein target dengan sensitivitas tinggi. Deteksi dilakukan dengan menambahkan substrat enzim yang menghasilkan perubahan warna. Intensitas warna diukur menggunakan spektrofotometer mikroplat pada panjang gelombang 450 nm, merepresentasikan konsentrasi protein TGF- β 1 dalam sampel (Crowter, 2009).

Proses freeze drying berpotensi menurunkan aktivitas bioaktif faktor pertumbuhan, termasuk TGF- β 1. Krioprotektan seperti trehalosa berperan penting dalam melindungi komponen bioaktif selama *freeze-drying* dengan membentuk lapisan pelindung untuk mencegah denaturasi protein. Trehalosa bekerja dengan menggantikan air dalam struktur molekul dan menjaga stabilitas protein selama dehidrasi dan pembekuan (Chaudhuri et al., 2023). Penambahan krioprotektan ini memungkinkan analisis ELISA menghasilkan data akurat terkait konsentrasi protein dalam sampel, meskipun telah melalui proses pengawetan.

2.1.7 Efikasi

Efikasi pada pengujian sesuatu bahan yang akan digunakan untuk bahan terapi regeneratif merupakan aspek yang penting untuk mengetahui pengaruh bahan pada penyembuhan luka. Metode *wound scratch* merupakan metode yang digunakan sebagai model luka kronis akut dengan menilai kemampuan migrasi sel dan regenerasi jaringan. Metode tersebut melibatkan pembuatan luka linear pada lapisan monolayer *freeze drying*.

Kecepatan dan kemampuan sel dalam bermigrasi dan menyembuhkan luka akan menjadi indikator yang diamati untuk melihat efektivitas sekretom yang telah melalui proses *freeze dry* (Cheng et al., 2020).

2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Beberapa penelitian terdahulu yang mengkaji penggunaan trehalosa sebagai krioprotektan telah terbukti efektif dalam menjaga stabilitas sekretom atau material biologis lainnya selama *freeze-drying*. Penelitian sebelumnya lebih berfokus pada suhu dan kondisi penyimpanan tanpa mengoptimalkan konsentrasi trehalosa, terutama pada suhu ruang. Rogulska et al. (2024) menunjukkan bahwa trehalosa mampu mengurangi kerusakan struktur protein pada suhu rendah, tetapi penelitian tersebut tidak mengeksplorasi variasi optimal konsentrasi trehalosa untuk penyimpanan pada suhu ruang. Kang et al. (2023) juga menemukan bahwa trehalosa memberikan perlindungan lebih baik dibandingkan dengan mannitol dalam *freeze-drying* EVs, akan tetapi pengamatan yang dilakukan terbatas pada struktur fisik tanpa menguji bioaktivitas molekul setelah rehidrasi (Tabel 2.1).

Tabel 2. 1 Studi Literatur Hasil Penelitian Terdahulu

Penulis	Judul	Metode	Hasil
1	2	3	4
Schauer et al., 2021	Prehospital trauma care in the Department of Defense: A report from the Department of Defense Trauma Registry	Analisis registri trauma Departemen Pertahanan untuk mengevaluasi perawatan pra-rumah sakit. Analisis regresi logistik digunakan untuk mengidentifikasi faktor yang berkontribusi pada kelangsungan hidup Uji <i>Chi-square</i> diterapkan untuk menguji hubungan antara variabel kategorikal seperti jenis cedera dan intervensi.	Perawatan pra-rumah sakit yang lebih baik meningkatkan peluang kelangsungan hidup pasien trauma.
Mardones et al., 2020	Protective Effect of Trehalosa on Protein Integrity During Freeze-Drying	<i>Freeze-drying</i> sekretome tali pusat dengan konsentrasi optimal <i>trehalosa</i> . Anaisis UV-Vis dan HPLC untuk mengukur stabilitas dan bioaktivitas Analisis data menggunakan uji statistik ANOVA menunjukkan bahwa perlindungan bioaktivitas signifikan pada $p < 0.05$ untuk <i>Trehalosa</i> konsentrasi 5%.	<i>Trehalosa</i> mempertahankan lebih dari 80% bioaktivitas sekretome, melindungi struktur protein dari denaturasi

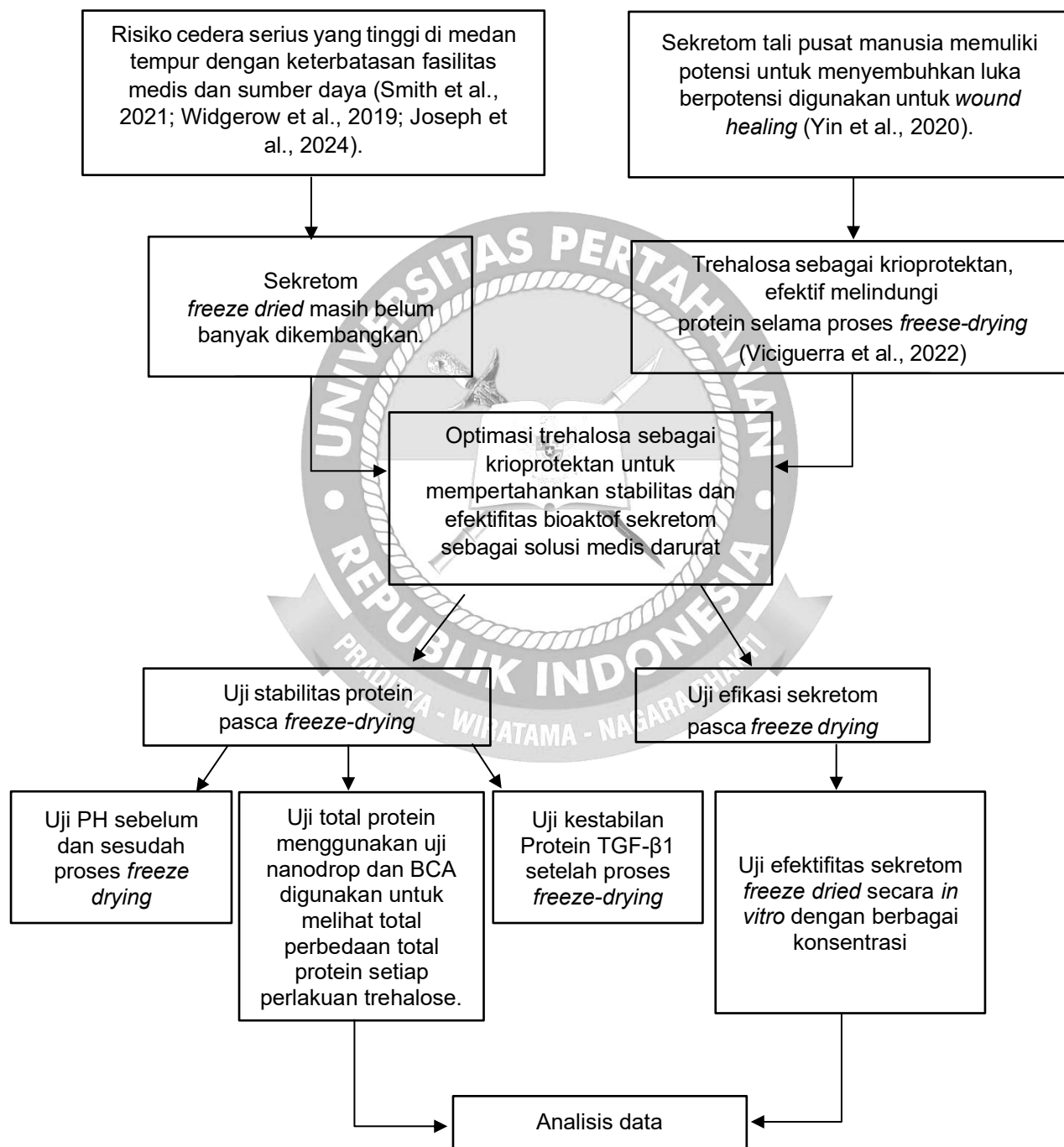
1	2	3	4
Murray et al., 2024	Trehalosa in cryopreservation: Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities	Kajian literatur tentang penggunaan trehalosa dalam kriopreservasi; uji penetrasi sel dan modifikasi kimia Analisis data menggunakan Meta-analisis dari beberapa studi sebelumnya	Trehalosa menunjukkan potensi tinggi sebagai agen krioprotektif dengan permeabilitas rendah dan toksisitas minimal Modifikasi kimia trehalosa melalui konjugasi CPP dapat meningkatkan efisiensi pengiriman intra-seluler.
Chouaib et al., 2023	Towards the Standardization of Mesenchymal Stem Cell Secretome-Derived Product Manufacturing for Tissue Regeneration	Mengevaluasi berbagai protokol produksi sekretom MSC, termasuk teknik isolasi dan purifikasi. Studi menekankan pentingnya standarisasi metode manufaktur untuk meningkatkan konsistensi produk dalam terapi jaringan. Statistik deskriptif digunakan untuk membandingkan efektivitas berbagai protok manufaktur. Analisis regresi linier digunakan untuk mengevaluasi korelasi antara parameter produksi dan hasil akhir.	Ditemukan bahwa variasi dalam protokol produksi dapat mempengaruhi komposisi dan potensi terapeutik sekretom Standarisasi protokol dianggap krusial untuk memastikan reproduktibilitas hasil berbagai laboratorium dan skala industri.

1	2	3	4
Rogulska et al., 2024	Storage condition affect the composition of the lyophilized secretome multipotent mesenchymal stromal cells	Studi ini mengevaluasi efek kondisi penyimpanan (suhu dan kelembapan) terhadap stabilitas dan komposisi sekretom liofilisasi MSC. Uji komposisi dilakukan dengan kromatografi cairan dan spektrometri massa. ANOVA digunakan untuk mengevaluasi perbedaan komposisi sekretom, bawah berbagai kondisi penyimpanan. Uji <i>post-hoc Tukey</i> dilakukan untuk perbandingan antar kelompok penyimpanan.	Hasil menunjukkan bahwa kondisi penyimpanan yang tidak tepat dapat mempengaruhi komposisi protein dan aktivitas sekretom. Penyimpanan optimal pada suhu rendah direkomendasikan untuk mempertahankan kualitas sekretom.
Widowati et al., 2024	Wound healing potent of lyophilized secretome gel from human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells	Pengembangan gel sekretom liofilisasi dari MSC Wharton's Jelly untuk pengujian penyembuhan luka. Uji <i>in vitro</i> dilakukan menggunakan kultur fibroblas, dan uji <i>in vivo</i> menggunakan model hewan. Uji <i>t-te</i> dan uji Mann-Whitney digunakan untuk membandingkan efektivitas penyembuhan luka antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.	Gel sekretom terbukti mempercepat regenerasi jaringan dan meningkatkan penyembuhan luka secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Produk ini memiliki potensi besar dalam aplikasi klinis untuk penyembuhan luka.

1	2	3	4
Wu et al., 2021	Osmometric measurements of cryoprotective agent permeation into tissues	Pengukuran osmotik dilakukan untuk menilai penetrasi agen krioprotektif (seperti DMSO dan trehalosa) ke dalam jaringan biologis pada berbagai interval waktu. Pengujian menggunakan alat osmometers dengan variasi konsentrasi dan waktu inkubasi. Uji <i>t-test</i> digunakan untuk membandingkan tingkat penetrasi agen krioprotektan antara jaringan yang berbeda dan kondisi waktu yang bervariasi. Analisis regresi <i>nonlinier</i> juga diterapkan untuk memodelkan dinamika permeasi.	Hasil menunjukkan bahwa permeasi agen krioprotektan berbeda-beda tergantung jenis jaringan dan konsentrasi. Jaringan tertentu membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai saturasi, dan konsentrasi optimal harus disesuaikan dengan jenis jaringan yang ditargetkan.

2.3 Kerangka Berpikir

Berikut merupakan kerangka berpikir dalam penelitian ini.



Gambar 2. 4 Kerangka Berpikir Penelitian Skripsi