

FAKTOR SUHU DAN LIOPROTEKTAN SUKROSA TERHADAP STABILISASI FIBRONEKTIN DALAM SEDIAAN SERBUK SERUM OTOLOGUS

Mervina Rondonuwu, Iman P. Maksu*, Sutarya Enus, Toto Subroto,
Soetijoso Soemitro

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Padjadjaran, 45363 Jatinangor, Sumedang, West Java, Indonesia

*E-mail: ip_maksum@unpad.ac.id

Abstrak

Serum otologus mengandung faktor pertumbuhan seperti EGF, TGF- β , vitamin A, dan fibronectin, namun sediaan dalam bentuk cairan mudah rusak dan hanya stabil selama 1 bulan pada penyimpanan suhu 4⁰C. Serum otologus dibuat dalam bentuk sediaan kering melalui proses liofilisasi. Dalam tahapan liofilisasi protein mengalami *stress denaturation*, karena itu dilakukan penambahan lioprotektan sukrosa sebagai stabilisator protein. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kestabilan kadar dan karakter fibronectin pada serum otologus serbuk beku-kering yang telah ditambahkan sukrosa dan disimpan pada suhu 4⁰C. Penelitian ini dilakukan studi komparatif dan uji non klinis pada darah 3 orang sampel, dilakukan pengambilan darah 100 mL, dibekukan, sentrifugasi pada 5000 g (10 menit), dan diperoleh serum sebanyak ~20 mL. Sampel serum diencerkan dan sebagian sampel serum ditambahkan sukrosa 60 mM. Pengukuran kestabilan kadar fibronectin menggunakan metode ELISA dan karakter fibronectin menggunakan HPLC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar fibronectin yang disimpan pada suhu 4⁰C lebih stabil dibandingkan dengan yang disimpan pada suhu ruang selama lima bulan dengan penurunan 80%, dengan kadar fibronectin masih $\geq 21 \mu\text{g/mL}$ (kadar Fibronectin dalam serum yang masih dapat digunakan), dan karakter fibronectin sebelum dan sesudah liofilisasi tidak terjadi perbedaan dimana pola penurunan luas area mengikuti penurunan persen kadar fibronectin.

Kata kunci: ELISA, Fibronectin, Liofilisasi, Serum Otologus, Suhu, Sukrosa.

THE EFFECT OF TEMPERATURE AND LYOPROTECTANT SUCROSE AGAINST STABILIZATION OF FIBRONECTIN IN SOLID PROTEINS OF AUTOLOGOUS SERUM

Abstract

Autologous serum contains growth factors such as EGF, TGF- β , and fibronectin, however serum in liquid form can be easily damaged and stable just 1 month at 4⁰C storage. The autologous serum is made in dry forms through lyophilization process. In lyophilization stage, protein through stress denaturation, therefore an addition of sucrose was used as a protein stabilizer or lyoprotectant. The purpose of this research is to determine the stability of fibronectin concentration and character in solid proteins of serum with lyoprotectant sucrose and stored in 4⁰C. This research was conducted comparative studies and clinical trials on three blood samples from humans, 100 mL for each samples, and then freeze the sample, sample was centrifuged at 5000 g (10 min), to obtained ~20 mL of serum. Serum was diluted, and partially of sampel serum was added with 60 mM sucrose. The measurement of fibronectin concentration stability using ELISA method, and the character of fibronectin using HPLC. The results showed that the fibronectin concentration in 4⁰C more stable than in room temperature for five months, with decrease until 80%, with the concentration of fibronectin still 21 μ g/mL (fibronectin in the serum that are still usable), and the character of fibronectin before and after lyophilization is no differences in the pattern of decline in the area following the percent decrease in fibronectin concentration.

Key words: ELISA, Fibronectin, Lyophilization, Autologous Serum, Temperature, Sucrose.

Pendahuluan

Terdapat banyak kasus kelainan mata, salah satunya adalah penyakit *dry eye*. *Dry eye* terjadi ketika mata tidak memproduksi air mata dengan benar, sehingga kekurangan air mata, atau air mata menguap terlalu cepat yang berpotensi pada kerusakan permukaan mata. Penderita mengalami iritasi ringan sementara, hingga terjadi kekeringan terus-menerus, gatal, kemerahan dan rasa nyeri.¹ Jika tidak dilakukan penanganan yang tepat maka bisa mengakibatkan terjadinya peradangan kronis dari selaput lendir konjungtiva, defek epitel persisten disertai pengurangan tajam penglihatan hingga dapat mengakibatkan kebutaan.²

Terhadap penderita ini direkomendasikan untuk diberikan tetes mata serum otologus sebagai pengganti tetes mata buatan. Serum otologus telah digunakan untuk pengobatan *dry eye* kronis, defek epitel persisten dan gangguan permukaan mata parah lainnya,³⁻⁵ karena serum otologus mempunyai kesamaan komponen dengan yang dimiliki oleh air mata.⁴⁻⁶ Serum otologus mengandung sifat-sifat biokimia (faktor-faktor epiteliotropik) yang sama dengan air mata, dan tidak dimiliki oleh pengganti air mata biasa atau sediaan obat tetes mata lainnya, serum otologus mengandung faktor pertumbuhan, seperti *EGF* (*Epidermal Growth Factor*), *TGF- β* (*Transforming growth factor- β*), fibronektin, dan vitamin A.^{4,6} Salah satu komponen penting yang berperan dalam proses *wound healing* adalah fibronektin. Fibronektin berfungsi untuk adhesi sel, faktor pertumbuhan, migrasi-diferensiasi sel, dan penting dalam proses penyembuhan defek epitel kornea.^{3,7} Saat terjadi defek, fibronektin dan fibrin muncul di daerah yang terkena defek dan segera memulai penyembuhan.

Serum otologus cairan tidak stabil dalam waktu lama yakni hanya dapat bertahan selama satu bulan saat disimpan pada suhu 4⁰C dan akan bertahan dalam jangka waktu tiga bulan jika disimpan pada suhu -20⁰C.^{5,8} Perlu adanya simpanan serum otologus yang tahan lama, praktis di bawah kemana saja, mudah dalam pemakaiannya. Strategi yang dilakukan adalah pembuatan ketersediaan serum otologus dalam bentuk serbuk beku-kering melalui proses liofilisasi (*freeze-drying*),⁹ namun dalam tahapan liofilisasi bisa menimbulkan *stress* yang akan membuat protein mengalami denaturasi.¹⁰ Keadaan ini menyebabkan protein tidak stabil, mudah terdenaturasi dan komponen yang terdenaturasi akan membentuk agregat dalam serum otologus, sehingga karakter fibronektin serum otologus sebelum dan sesudah liofilisasi akan dilihat menggunakan HPLC.¹¹

Dilakukan upaya untuk melindungi protein selama proses liofilisasi, krioprotektan yang melindungi protein selama proses pembekuan dan lioprotektan yang melindungi protein selama proses pengeringan, dengan penambahan zat yang dapat menstabilkan protein. Pada penelitian sebelumnya, sukrosa menunjukkan potensi yang baik diantara gula non pereduksi lainnya yang dapat

digunakan untuk menjaga kestabilan protein.¹² Pada penelitian Cleland¹³ menunjukkan bahwa sukrosa dengan konsentrasi ≥ 60 mM dapat mempertahankan kestabilan protein antibodi monoklonal (rhuMAb HER2) yang telah diliofilisasi.

Sediaan tetes mata serum otologus dalam bentuk serbuk menuntut penyimpanan pada suhu yang rendah, untuk menjaga keaktifan komponen-komponen dalam serum otologus sehingga mampu bertahan dalam jangka panjang.¹² Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, lioprotektan sukrosa dapat mempertahankan kestabilan EGF dan TGF- 1 hingga enam bulan pada suhu simpan 4°C.¹⁴

Tujuan penelitian ini menentukan kadar fibronectin serum otologus pada sediaan serbuk beku-kering selama lima bulan dan suhu 4°C setelah penambahan lioprotektan sukrosa dan menentukan karakterisasi fibronectin serum otologus sebelum dan tiga bulan setelah liofilisasi pada penyimpanan 4°C dengan menggunakan HPLC.

Bahan dan Metode

Bahan Penelelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah manusia untuk dibuat serum, natrium klorida fisiologis untuk pengenceran serum dan sukrosa sebagai lioprotektan. Bahan kimia untuk keperluan metode ELISA, seperti standar fibronectin (Platinum ELISA, Ready-to-use Sandwich ELISA, eBioscience, North America and Europe), *wash buffer*, larutan substrat TMB, *assay buffer*, *biotin-conjugate*, streptavidin-HRP, *red dye*, *green dye*, *blue dye*, *stop solution*, untuk keperluan HPLC, seperti aquabidest dan asam trifloroasetat (TFA).

Metode Penelitian

1. Pembuatan serum otologus

Serum otologus dibuat sesuai dengan parameter yang digunakan dalam pembuatan serum otologus mengikuti Geerling.⁶ Darah diambil sebanyak 100 mL, dibiarkan menggumpal selama 2 jam agar serum keluar, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 5000 g (suhu 4°C). Diperoleh serum sebanyak 20 mL, serum kemudian diencerkan dengan natrium klorida 0,9% (5x). Serum encer yang sebagian ditambahkan sukrosa 60 mM,¹³ sehingga diperoleh serum natif (serum yang tidak diencerkan dan tidak ditambah sukrosa), serum encer yang mengandung sukrosa dan serum encer yang tidak mengandung sukrosa. Masing-masing serum dimasukkan ke dalam *microtube* sebanyak 1 mL serum.

2. *Freeze dry*

Serum otologus cair baik yang mengandung sukrosa dan yang tidak mengandung sukrosa dimasukkan ke dalam tabung *microtube*. Serum dibekukan di dalam

pendingin sampai benar-benar membeku, agar saat dipasang pada alat *freeze dry* serum di dalam *microtube* tidak akan terhisap keluar. Serum beku kemudian dimasukkan ke dalam tabung *freeze dry* dan alat *freeze dry* dijalankan. Proses *freeze dry* berlangsung selama 3-4 hari (\pm 24 jam) sampai benar-benar diperoleh serum dalam sediaan serbuk beku-kering.

3. Analisis sampel dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Prinsip ELISA yakni interaksi antara antigen-antibodi, dengan tahapan menggunakan *sandwich* ELISA (Platinum ELISA, *Ready-to-use Sandwich* ELISA, eBioscience, North America and Europe). Sumur ELISA disipkan terlebih dahulu, kemudian sampel serum diencerkan terlebih dahulu dengan *assay buffer* (10000x), pada sumur sampel ELISA dimasukkan 50 μ L sampel, dan pada sumur standar dimasukkan 100 μ L standar, *assay buffer* 100 μ L pada sumur blanko dan 50 μ L pada sumur sampel, kemudian ditambahkan 50 μ L *biotin conjugate* ke semua sumur. Campuran dalam sumur diinkubasi selama 2 jam (pada suhu ruang, 18-25⁰C). Pekerjaan dilanjutkan dengan membuang larutan dalam sumur dan dicuci dengan *wash buffer* 200 μ L (berulang), semua sumur ditambahkan streptavidin-HRP 100 μ L dan diinkubasi selama 1 jam (pada suhu ruang, 18-25⁰C). Larutan di dalam sumur dibuang kembali, dicuci dengan *wash buffer* 200 μ L (berulang), ditambahkan TMB *substrate solution* 100 μ l dan diinkubasi selama 10 menit (pada suhu ruang, 18-25⁰C). Larutan ditambahkan *stop solution* 100 μ L pada semua sumur dan diukur dengan ELISA reader pada 450 nm.

4. Analisis sampel dengan metode *High Performance liquid Chromatography* (HPLC)

Pekerjaan HPLC menggunakan kolom C₁₈ sebagai fase diam untuk pemisahan fase terbalik eluen atau fase gerak yang digunakan adalah air dicampur TFA (0,1%) elusi dengan cara isokratik, set detektor pada panjang gelombang 220 nm dan *flow rate* 1 ml/menit, dengan waktu selama 25 menit. Sebelum diinjeksikan sampel serum disaring terlebih dahulu menggunakan SPE dengan penjerap *chromosorb* 18, sampel serum yang natif dipipet sebanyak 0,5 mL dan disaring menggunakan *Solid Phase Extraction* (SPE), protein serum yang tersaring pada SPE, kemudian disaring lagi dengan menambahkan akuabides sebanyak 1 mL, selanjutnya ditambahkan buffer sebanyak 1 mL. Sampel hasil penyaringan kemudian dipipet 20 μ L dan diinjeksikan pada injektor. Preparasi terhadap sampel serum serbuk beku-kering dengan menambahkan akuabides sampai volume sebelum dikeringkan yaitu sampai 1 mL, kemudian dilakukan penyaringan dengan proses yang sama dengan sampel natif, kemudian dilakukan pengukuran pada alat HPLC

Hasil Fibronektin

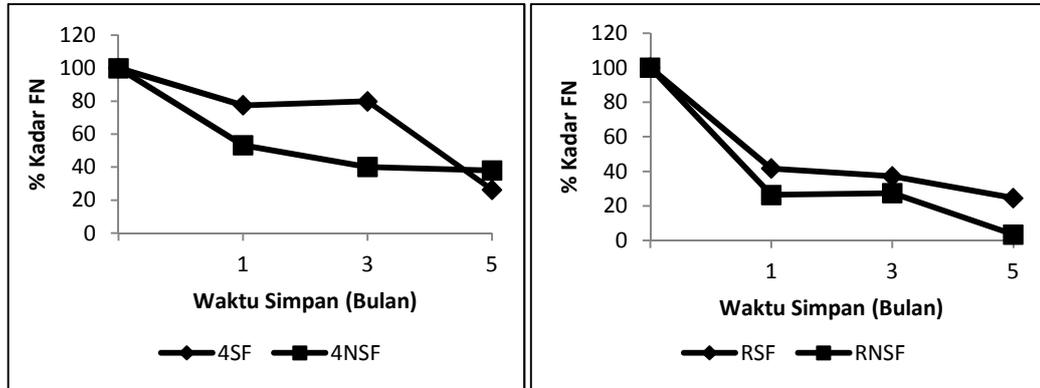
Kadar Fibronektin

Kadar fibronektin diukur menggunakan metode ELISA, fibronektin yang terukur adalah yang tidak mengalami denaturasi atau kerusakan lainnya. Pola penurunan persen kadar fibronektin terjadi berbeda pada masing-masing sampel. Pada pengukuran bulan pertama dengan metode ELISA setiap sampel menunjukkan persen penurunannya masing-masing pada Gambar 1 dari pengukuran kadar natif baik sampel yang mengandung sukrosa (4SF dan RSF) dan sampel yang tidak mengandung sukrosa (4NSF dan RNSF). Sampel 4SF turun 20% dan sampel 4NSF dan RSF terjadi penurunan ~50%, sedangkan sampel RNSF terjadi penurunan > 50% pada setiap individu.

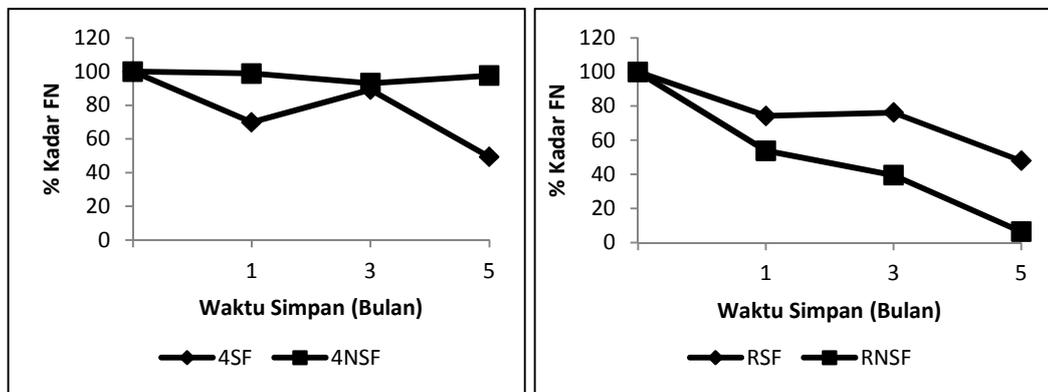
Pengukuran bulan ketiga, kadar fibronektin yang disimpan pada suhu 4°C menunjukkan % kadar fibronektin yang masih mirip dengan pengukuran bulan pertama, kadar fibronektin masih tetap stabil baik sampel yang mengandung sukrosa dan tidak mengandung sukrosa, sedangkan pada sampel yang disimpan pada suhu ruang terlihat sampel yang mengandung sukrosa (RSF) pada individu 2 masih lebih stabil dengan penurunan 20% dibandingkan yang tidak ditambahkan sukrosa (RNSF) dengan penurunan 60%.

Pada pengukuran bulan kelima, kadar fibronektin pada sampel yang mengandung sukrosa (4SF dan 4NSF) lebih stabil dari sampel yang disimpan pada suhu ruang (RSF dan RNSF) dengan persentase kadar akhir >20% (penurunan 80%) pada semua individu, dan sampel yang disimpan pada suhu ruang dengan penambahan sukrosa (RSF) lebih stabil dari sampel yang tidak ditambahkan sukrosa (RNSF) dengan % kadar akhirnya < 10% (penurunan > 90%).

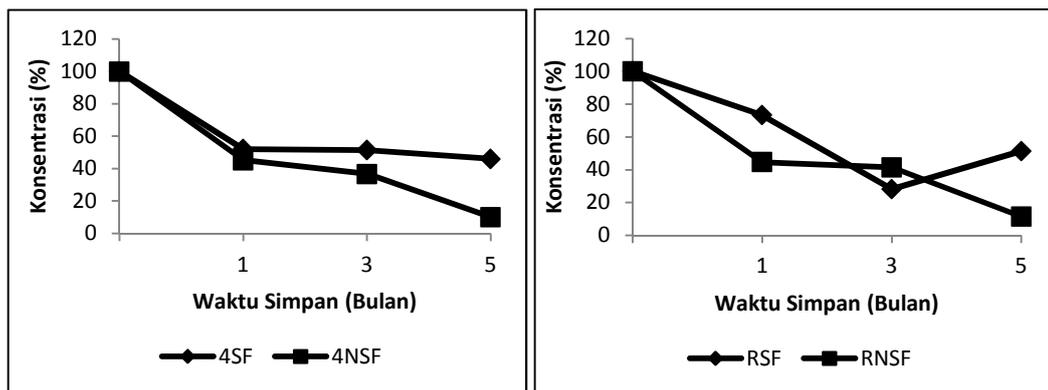
Individu pertama



Individu kedua



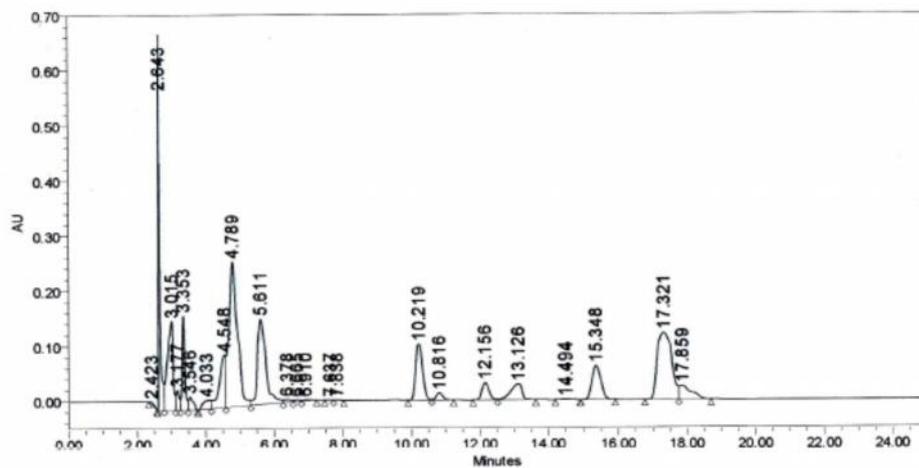
Individu ketiga



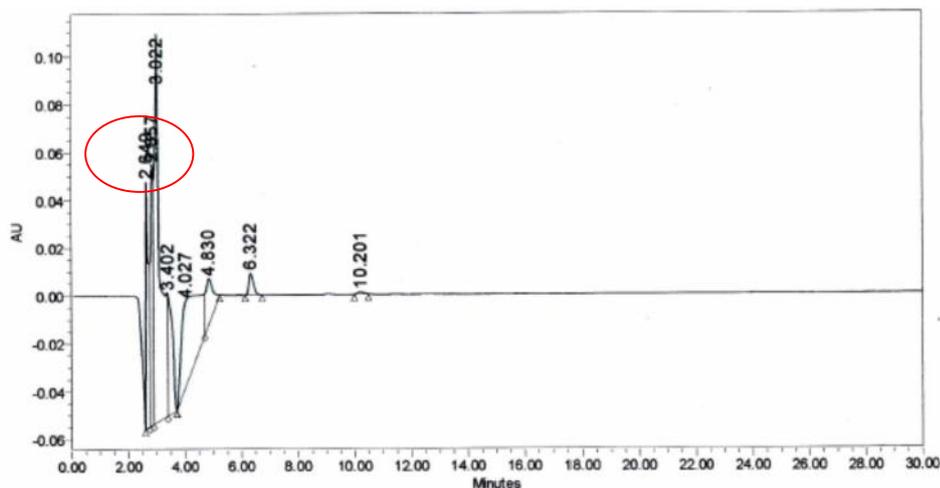
Gambar 1 Persentase kadar fibronektin yang disimpan pada suhu ruang dan suhu 4⁰C selama penyimpanan lima bulan. 4SF: suhu 4⁰C, mengandung sukrosa, *freeze dry*; 4NSF: suhu 4⁰C, non sukrosa; *freeze dry*; RSF: suhu ruang, mengandung sukrosa, *freeze dry*; RNSF: suhu ruang, non sukrosa, *freeze dry*

Karakter Fibronektin

Pengukuran dilakukan terlebih dahulu pada standar fibronektin baik 40 ng, 20 ng, dan 10 ng, dimana terdapat pola kromatogram yang mirip. Pada standar 40 ng muncul sebanyak 23 puncak, sedangkan pada standar 20 ng dan standar 10 ng muncul 14 puncak. Pada penelitian Chakraborty & Bhattacharyya (2004) pengukuran salah satu tipe fibronektin yaitu fibronektin tipe III muncul 4 puncak. Dipilih puncak pada waktu retensi 2,6 dan 3,0 sebagai indikator yang akan digunakan pada sampel.



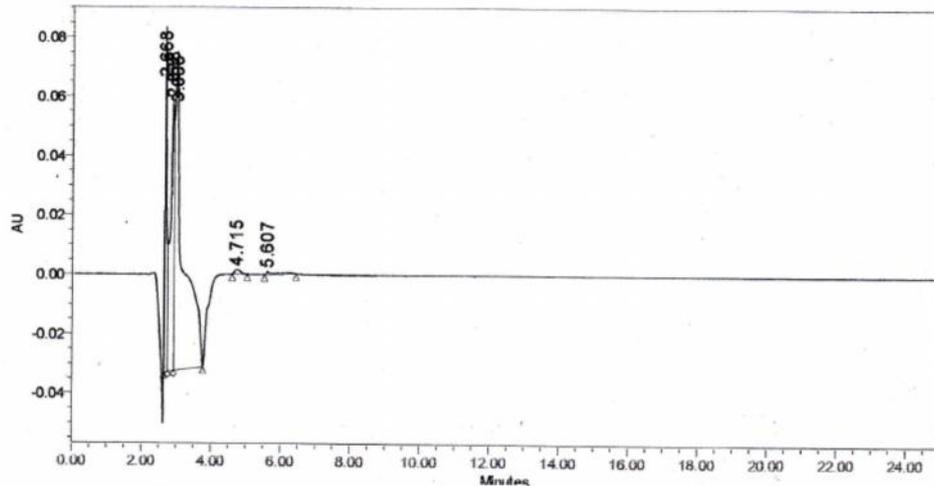
Gambar 2 Hasil kromatogram HPLC standar fibronektin (40 ng)



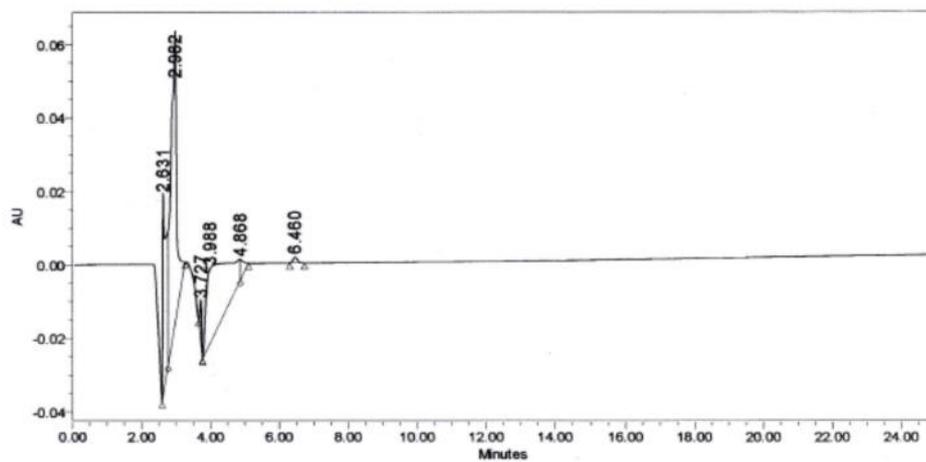
Gambar 3 Hasil kromatogram HPLC sampel natif

Pengukuran pada sampel natif dan sampel hasil *freeze dry* menunjukkan pola kromatogram yang mirip dan adanya puncak pada waktu retensi 2,6 dan 3,0. Pada

Tabel 1 terlihat penurunan luas area pada sampel hasil *freeze dry* pada waktu retensi 2,6 dan 3,0, meskipun sampel yang tanpa mengandung sukrosa mengalami penurunan lebih besar dibandingkan sampel yang mengandung sukrosa



Gambar 4 Hasil kromatogram HPLC hasil *freeze dry* (mengandung sukrosa)

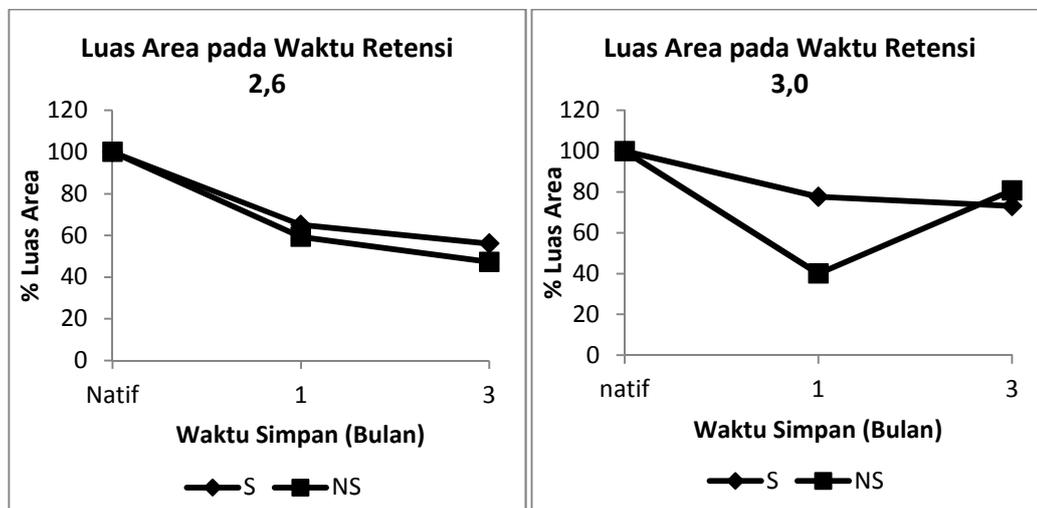


Gambar 5 Hasil kromatogram HPLC hasil *freeze dry* (tanpa sukrosa)

Tabel 1 Luas area sampel natif dan sampel hasil *freeze dry*

Waktu Retensi	Sampel Natif	1 bulan (S)	1 bulan (NS)	3 bulan (S)	3 bulan (NS)
	Luas Area	Luas Area	Luas Area	Luas Area	Luas Area
2,6	665.248	432.824	394.437	373.122	314.647
3,0	2.412.446	1.872.695	964.189	1.761.943	1.948.034

Karakter fibronektin dapat dilihat dari pola penurunan luas area sampel natif dan sampel hasil *freeze dry* yang disimpan pada suhu 4⁰C pada Gambar 6, penurunan % luas area terjadi baik pada waktu retensi 2,6 dan 3,0 pada pengukuran sampel hasil *freeze dry* tiga bulan. Sampel yang mengandung sukrosa terlihat lebih stabil pada pengukuran bulan pertama dengan penurunan 35% pada waktu retensi 2,6 dan 23% pada waktu retensi 3,0, dibandingkan dengan sampel yang tidak mengandung sukrosa terjadi penurunan 39% pada waktu retensi 2,6 dan 60% pada waktu retensi 3,0. Pada pengukuran bulan ke tiga sampel sukrosa pada waktu retensi 2,6 dan 3,0 masih tetap stabil dengan penurunan < 50% sedangkan sampel tanpa sukrosa pada waktu retensi 2,6 turun 43%. Pola penurunan % luas area ini sejalan dengan % penurunan kadar fibronektin pada pengukuran dengan metode ELISA



Gambar 6 Penurunan % luas area sampel hasil *freeze dry* 3 bulan yang disimpan pada suhu 4⁰C pada waktu retensi 2,6 dan 3,0

Pembahasan

Pengaruh *Freeze Dry*

Serum otologus dalam bentuk cairan hanya dapat bertahan selama satu bulan pada penyimpanan suhu 4⁰C dan bertahan selama tiga bulan pada penyimpanan suhu -20⁰C yakni EGF, vitamin A, dan TGF- yang ada di dalam serum.^{5,8} Faktor-faktor pertumbuhan yang ada di dalam serum otologus berperan penting dalam proses *wound healing*, salah satu faktor penting dalam *wound healing* adalah protein perekat yang sekaligus berfungsi dalam proses adhesi sel migrasi dan diferensiasi sel yaitu fibronektin, sehingga fibronektin dalam serum perlu dijaga untuk tetap stabil agar dapat menjalankan fungsinya dengan baik. Serum otologus dibuat dalam sediaan serbuk beku-kering melalui tahapan pembekuan dan tahapan pengeringan di bawah vakum. Sediaan serum dalam bentuk serbuk beku-kering selain bisa digunakan dalam jangka waktu lama, sediaan ini memudahkan pasien

dalam penyimpanan, dalam pemakaian, dan mudah di bawah kemana saja saat keluar rumah. Pada tahapan *freeze dry* ini fibronectin dalam serum akan dijaga, sehingga tetap stabil dan bertahan dalam jangka waktu panjang. Proses *freeze dry* menjadi bagian penting dalam stabilisasi serum otologus, proses ini biasa dilakukan untuk mengatasi ketidakstabilan beberapa protein, protein yang ada dalam bentuk cairan dibuat menjadi bentuk padatan untuk meningkatkan waktu simpannya.¹⁰ Fibronectin dalam serum otologus yang disimpan pada suhu simpan 4°C dengan penambahan lioprotektan sukrosa hasil liofilisasi stabil hingga penyimpanan bulan ke lima dengan persentase kadar akhir $\geq 20\%$. Pengukuran kadar fibronectin pada pengukuran 0 bulan hasil *freeze dry* terjadi penurunan kadar dari kadar natif, namun fibronectin dalam serum tetap stabil hingga penyimpanan lima bulan dengan kadar akhir fibronectin pada sampel pertama 53,6 $\mu\text{g/mL}$, sampel kedua 95,6 $\mu\text{g/mL}$, dan sampel ke tiga 141,6 $\mu\text{g/mL}$. Jumlah kadar akhir ini $\geq 21 \mu\text{g/mL}$ yaitu jumlah kadar fibronectin dalam air mata yang masih dapat digunakan sebagai obat tetes mata serum otologus.⁶

Pengaruh Penambahan Sukrosa

Pada tahapan *freeze dry* terjadi berbagai macam tekanan yang cenderung mengganggu kestabilan protein, dimana terjadi denaturasi pada protein yang tidak terlindungi.¹⁰ Perlu adanya penambahan penstabil protein dalam proses *freeze dry*. Gula sering digunakan sebagai penstabil protein yang nonspesifik dalam larutan selama beku-cair dan beku-kering, karena memiliki fungsi yang baik digunakan sebagai krioprotektan dan lioprotektan.¹⁰ Penelitian sebelumnya menunjukkan diantara gula non pereduksi lainnya sukrosa menunjukkan potensi yang baik dalam menstabilkan protein dibandingkan dengan prolin, manitol dan sorbitol.¹² Penelitian Indrayati,¹⁴ menunjukkan bahwa sukrosa menjaga kestabilan EGF dan TGF dalam serbuk beku-kering hingga enam bulan. Pada penelitian Cleland¹³ menunjukkan bahwa sukrosa dengan konsentrasi $\geq 60 \text{ mM}$ dapat mempertahankan kestabilan protein antibodi monoklonal (rhuMAb HER2) yang telah diliofilisasi. Kadar fibronectin hingga lima bulan pada sampel sampel 4SF $> 50 \mu\text{g/mL}$, dan pada sampel RSF $> 70 \mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan sampel yang tanpa penambahan sukrosa (RNSF) mengalami penurunan yang drastis dengan kadar akhir $\leq 21 \mu\text{g/mL}$, sehingga tidak dapat digunakan sebagai obat tetes mata serum otologus.

Pengaruh Suhu Simpan

Kestabilan protein dalam bentuk padatan juga dipengaruhi oleh suhu penyimpanan, dimana kadar fibronectin dalam sampel serum hasil *freeze dry* yang ditambahkan lioprotektan sukrosa dapat dipertahankan hingga penyimpanan bulan ke lima, dengan kadar yang masih dapat diterima sebagai obat tetes mata

serum otologus yaitu $> 21 \mu\text{g/mL}$ yang disimpan pada suhu simpan 4°C . Penyimpanan suhu rendah (4°C) dapat menstabilkan protein dalam serum. Serum otologus cairan dapat bertahan selama tiga bulan pada penyimpanan suhu -20°C , tetapi hanya bertahan satu bulan pada penyimpanan suhu 4°C .^{5,8} Sampel serum dalam sediaan serbuk beku-kering yang disimpan pada suhu 4°C dan suhu -20°C dapat mempertahankan kadar EGF dan TGF- β 1 hingga penyimpanan bulan ke enam.¹⁴ Ketersediaan serum yang dapat disimpan pada suhu 4°C sangat memudahkan pasien dengan tersedianya serum hasil *freeze dry* yang bisa bertahan lama guna pengobatan penyakit *dry eye* yang bersifat kronis dan menahun.

Kesimpulan

Serum otologus dalam sediaan serbuk beku kering dengan penambahan lioprotektan sukrosa yang disimpan pada suhu 4°C dapat stabil mempertahankan kadar fibronektin hingga waktu simpan lima bulan yakni penurunan kadar 80 % dengan jumlah kadar $\geq 21 \mu\text{g/mL}$ yaitu jumlah kadar fibronektin dalam air mata yang masih dapat digunakan, dan karakter fibronektin sebelum dan sesudah liofilisasi tidak terjadi perbedaan, dimana pola penurunan % luas area sejalan dengan % penurunan kadar fibronektin yang disimpan pada suhu 4°C .

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Padjadjaran, Ketua Program Pascasarjana, Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Ketua Jurusan Kimia, Kepala Laboratorium dan seluruh staf Laboratorium Penelitian Kimia, dan staf Rumah Sakit Mata Cicendo, Bandung, Indonesia yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Daftar pustaka

1. Lee A.J., Lee J., Saw S.M., Gazzard G., Koh, D., Widjaja D. & Tan D.T. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:1347-51.
2. Lemp, M.A., Dogru, M., Stern, M.E., Smith, J.A., Foulks, G.N. & Tsubota, K. Changing trends in the definition and diagnosis of dry eyes. *Am J Ophthalmol*. 2007: 507e1-507e4.
3. Liu, L., Hartwig, D., Harloff, S., Herminghaus, P., Wedel, T., Geerling, G. An optimised protocol for the production of Autologous Serum Eyedrops. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2005;243(7):706-714.
4. Quinto, G.G., Campos, M. & Behrens, A. Autologous Serum for Ocular Surface Diseases. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2008;71: 47-54.
5. Tsubota, K., Goto, E., Fujita, H., Ono, M., Inoue, H. & Saito, I. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *British Journal of Ophthalmology*. 1999;83(4):390-395.
6. Geerling, G., MacLennan, S., & Hartwig, D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*. 2004;88(11): 1467-1474.
7. Schwarzbauer, J.E., & Desimone, D.W. Fibronectins, their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011.
8. Herrero, V.R., & Molina, M. Autologous serum in the treatment of dry eye Syndrome. *Technological aspects*. 2008;83:521-524.
9. Ciurzy ska A. & Lenart A. Freeze-Drying – Application in Food Processing and Biotechnology. *Pol. J. Food Nutr. Sci*. 2011;61:165-171.
10. Wang, W. 'Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals'. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;203 (1-2):1-60.
11. Chakraborty P. D. & Bhattacharyya D. Isolation of Fibronectin Type III Like Peptide from Human Placental Extract used as Wound Healer. *Journal of Chromatography B*. 2004;818:67-73.
12. Enus, S., Maksum, I.P., Ishmayana, S., Subroto, T. & Soemitro, S. Stabilisasi Tetes Mata Serum Otologus dalam Sediaan Serbuk dengan Metode Freeze Drying menggunakan Lioprotektan. 2011.
13. Cleland, J.L., Lam, X., Kendrick, B., Yang, J., Yang, T.H., Overcashier, D., Brooks, D., Hsu, C. & Carpenter, J.F. A Specific Molar Ratio of Stabilizer to Protein is Required for Storage Stability of a Lyophilized Monoclonal Antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;90 (3):310-321.
14. Indrayati, L. Stabilisasi TGF- β 1(Transforming Growth Factor- β 1), EGF(Epidermal Growth Factor) dan Vitamin A pada Tetes Mata Serum Otologus dalam Sediaan Serbuk Kering Menggunakan Lioprotektan Sukrosa (Tesis). Bandung: Universitas Padjadjaran; 2014.