

VALIDASI PROSES PENCUCIAN MEMBRAN AMNION UNTUK GRAF AMNION

Basril, A., Febrida, A. dan Hilmy, N.
Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN, Jakarta

ABSTRAK

VALIDASI PROSES PENCUCIAN MEMBRAN AMNION UNTUK GRAF AMNION.

Setiap tahap perlakuan pada kegiatan Bank Jaringan harus divalidasi, termasuk proses pencucian membran amnion yang disiapkan sebagai graf amnion. Terdapat tiga tahapan validasi pada pemrosesan membran amnion yaitu: 1). Validasi teknik mengeluarkan mikroorganisme dari amnion menurut ISO 11737-1; 2). Validasi 9 kali pencucian menggunakan botol yang diisi air steril kecuali pada botol ke 5 dengan sodium hipoklorit 0,05% menurut Modul IAEA; dan 3). Validasi residu sodium hipoklorit setelah 9 kali pencucian. Setelah pencucian, jaringan amnion harus bebas partikel darah, residu sodium hipoklorit dan kontaminasi mikroba. Setiap tahapan validasi diulang tiga kali. Hasil menunjukkan bahwa faktor koreksi untuk efisiensi recovery adalah 3 dan faktor koreksi tersebut digunakan untuk estimasi *bioburden*. Empat kali pencucian pertama menurunkan kontaminasi mikroba sebesar 3 log step. Pencucian ke lima menggunakan sodium hipoklorit 0.05% dan selanjutnya dengan air steril hingga botol ke sembilan. Cairan pada botol kesembilan bebas dari residu sodium hipoklorit, kontaminasi mikroba dan partikel darah. Rata-rata bioburden dari amnion graf sebelum sterilisasi radiasi adalah 32 mikroba dan dosis sterilisasi digunakan adalah 25 kGy.

Kata kunci: *graf* amnion, validasi proses pencucian, ISO 11737-1, modul IAEA.

ABSTRACT

VALIDATION OF WASHING PROCESS OF AMNION MEMBRANE FOR AMNION

GRAFT. Each proces step in Tissue Banking should be validated including the washing process of amnion membranes to be prepared for amnion graft. Three steps of validation have been carried out i.e. 1. Validation of the technique for removal of microorganisms from amnion membrane according to ISO 11737-1; 2. Validation of nine times washing using 9 bottles containing sterile water except for bottle no. 5 containing 0.05 % sodium hypochlorite according to IAEA Module, and 3. Validation of the residue of sodium hypochlorite after nine times of washing. After washing, the amnion membrane should be free from blood particles, residue of sodium hypochlorite and microbial contamination. Each step of validation process was repeated three times. Results show that the correction factor for recovery efficiency was 3 for spore of *B.pumilus* and this correction factor was used for bioburden estimation. The first four times of washing, microbial contamination reduced by 3 log steps and after washing with 0.05% sodium hypochlorite followed by another four times with sterile water, the water of bottle no 9 was found to be free from microbial contamination, blood particle and residue of sodium hypochlorite. The average bioburden of lyophilized amnion graft before radiation sterilization was 32 microbes, and sterilization dose used was 25 kGy.

Key words: Amnion graft, validation, washing process, ISO 11737-1, IAEA Modul.

PENDAHULUAN

Graf Amnion telah digunakan secara rutin sebagai penutup luka seperti untuk penanganan luka bakar, luka akibat pengambilan kulit, dan *chronic granulating wound* (1-6). Disamping itu graf amnion saat ini sangat populer digunakan dalam bedah mata seperti reseksi konjungtiva, simblefaron, defek kornea dan pterigium (7-9).

Di Indonesia, seperti di unit luka RS. Djamil Padang saat ini graf amnion merupakan salah satu bahan yang digunakan dalam pe-

nanganan luka pada pasien. Di samping itu graft amnion juga dipakai untuk luka sunat dan luka operasi Caesar dengan hasil yang sangat baik (10-11). Di Rumah Sakit Kusta Sitanala, Tangerang, graf amnion dipakai secara rutin untuk pengobatan luka reaksi kusta, luka *trophic* dan luka bakar dengan kesembuhan dua kali lebih cepat dibandingkan dengan cara konvensional (12). Penelitian pemakaian amnion segar dan freeze-dried amnion pada bedah mata seperti untuk reseksi konjungtiva dan defek kornea telah pula dilakukan di Rumah Sakit Mata Cicendo, Ban-

dung. Hasilnya menunjukkan bahwa kedua macam graf amnion tersebut dapat digunakan untuk transplantasi pada rekonstruksi permukaan okular dengan hasil yang sama baiknya (13). Saat ini beberapa rumah sakit di Indonesia telah secara rutin menggunakan amnion liofilisasi steril radiasi untuk transplantasi pada bedah mata.

Amnion adalah selaput ketuban bagian dalam yang langsung berhubungan dengan *liquor amnii*/ air tuban, mempunyai efek *angiogenic* dan merangsang terjadinya granulasi pada luka. Amnion mempunyai sifat yang lentur sehingga dapat menutup permukaan luka dengan erat, di samping itu juga bersifat anti mikroba yang berfungsi untuk menurunkan populasi mikroba patogen pada luka infeksi. Amnion juga diduga mengandung asam hioloronat yang berfungsi untuk mencegah terjadinya jaringan parut (14-16).

Dari manfaat amnion yang disebutkan di atas, maka amnion perlu disiapkan agar selalu tersedia saat diperlukan. Salah satu cara persiapan amnion agar dapat disimpan untuk waktu yang lama adalah dengan pengeringan pada suhu beku/liofilisasi. Cara liofilisasi meminimalkan kerusakan jaringan dan komponen yang terkandung dalam amnion. Secara umum persiapan graft amnion liofilisasi menurut Modul IAEA adalah skrining amnion terhadap penyakit menular, pencucian untuk mengeliminasi darah dan lendir, *swab test* mikroba patogen, pencucian dengan air dan natrium hipoklorit (NaOCl) 0.05% agar amnion bebas darah lendir dan mikroba, perentangan amnion di atas kain kasa, pembekuan dan proses liofilisasi serta sterilisasi produk akhir dengan radiasi (17).

Pencucian merupakan proses penting dalam mempersiapkan graf amnion. Hal ini disebabkan karena pencucian dapat mengeliminasi darah dan lendir serta mikroba yang dapat menyebabkan pemindahan penyakit dari donor ke resipien. Oleh karena itu proses tersebut harus divalidasi untuk menghasilkan produk yang konsisten dan sesuai dengan ketentuan spesifikasi. Di antara spesifikasi yang dibutuhkan dari produk graf amnion adalah bebas residu NaOCl, bebas partikel darah dan minimal jumlah mikroba.

Penelitian ini ditujukan untuk membuktikan bahwa cara pencucian yang telah dilakukan untuk pembuatan membran amnion sesuai dengan standar. Disamping itu juga untuk mendapatkan nilai faktor koreksi untuk estimasi bioburden produk graf amnion juga dibuktikan.

BAHAN DAN METODA

Validasi Pencucian Amnion. Amnion didapat dari plasenta bayi yang dilahirkan oleh ibu

sehat yaitu bebas dari virus penyakit menular seperti HIV, hepatitis B dan C serta mikroba patogen, dengan partus normal di Rumah Sakit Ciptomangunkusumo, Jakarta. Amnion segera dipisahkan dari chorion dan dicuci dengan larutan salin steril, selanjutnya dimasukkan ke dalam kantong plastik steril yang mengandung larutan salin steril. Sebelum diproses amnion harus bebas dari kontaminasi mikroba patogen. Hanya amnion yang bebas dari bakteri patogen saja yang dapat diproses lebih lanjut untuk graf amnion.

Sembilan botol steril diisi dengan 400 ml air steril, kecuali botol nomor lima diisi dengan 400 ml larutan NaOCl 0,05%, disiapkan di bawah *laminar air flow* (LAF). Proses pencucian amnion dimulai dari botol pertama dan seterusnya, masing-masing dikocok dengan pengocok mekanik KARL KOLB selama 10 menit. Jumlah mikroba, residu NaOCl dan partikel darah dianalisa pada larutan yang terdapat pada botol 6, 7, 8 dan 9. Dari 400 ml larutan dibagi menjadi 200 ml untuk uji mikroba dan masing-masing 100 ml untuk uji residu natrium hipoklorit dan partikel darah. Residu NaOCl dan partikel darah ditentukan menurut USP XIII (18).

Faktor Koreksi. Faktor Koreksi adalah jumlah kontaminasi mikroba dibandingkan dengan jumlah mikroba yang terektraksi dengan satu kali pencucian. Percobaan dilakukan menurut ISO 11737-1.

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{\text{Jumlah mikroba awal}}{\text{Jumlah mikroba pencucian pertama (Wash 1)}}$$

Sampel amnion steril iradiasi berukuran 5 x 5 cm ditetesi 0,1 ml spora *Bacillus pumilus* E 604, sebagai standar untuk mikroba yang berbentuk spora dan *E. coli* sebagai standar untuk mikroba vegetatif. Inokulasi dibiarkan di bawah LAF selama 1, 3 dan 24 jam.

Inokulum mikroba pada amnion selanjutnya dikeluarkan menggunakan metode pengocokan yaitu sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril yang berisi 10 ml air steril dan dikocok selama 10 menit. Selanjutnya larutan yang berisi mikroba tersebut diencerkan lalu di tanam di dalam media padat *Trypticase Soy Agar* untuk *B. pumilus* dan *Eosin Methylene Blue Agar* untuk *E. coli*. Perlakuan diulangi sebanyak tiga kali. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 30° C untuk *B. pumilus* dan 37° C untuk *E. coli* masing-masing selama 3 hari dan setiap hari koloni mikroba dihitung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Residu NaOCl, partikel darah dan mikroba setelah pencucian botol ke 7-9 (Tabel 1) menunjukkan hasil negatif (tidak terdeteksi). Hal ini menunjukkan bahwa metode pencucian amnion di dalam botol yang berisi 400 ml air steril dan dikocok selama 10 menit, merupakan metode yang dapat dipertanggung jawabkan untuk mengeliminasi partikel darah, mikroba dan residu NaOCl. Natrium hipoklorit dengan konsentrasi 0,05% memberikan efektifitas yang baik dalam mengeliminasi mikroba yang terdapat dalam amnion. Hal ini disebabkan, selain NaOCl bersifat germisida, juga dapat melarutkan jaringan nekrotik seperti *blood clot* (19). Keefektifan tersebut telah dijelaskan pada penelitian terdahulu yaitu amnion yang mengandung mikroba sebesar 10 (2) sel pada pencucian ke-4, setelah direndam dalam larutan NaOCl 0,05% selama 10 menit (pencucian ke-5) memberikan hasil negatif dan juga pada pencucian berikutnya (20).

Tabel 1. Pencucian amnion pada botol 6 sampai 9

Parameter	Botol ke-			
	6	7	8	9
Mikrobiologi	-	-	-	-
Partikel darah	+	-	-	-
Residu NaOCl	+	-	-	-

Graf amnion adalah produk bahan biologi yang dipakai sebagai implan, dengan persyaratan harus bebas dari mikroba (steril). Sterilisasi dilakukan dengan cara iradiasi karena di antara metoda sterilisasi seperti pemanasan, autoklaf dan gas etilen oksida (ETO), radiasi gama sangat efektif untuk produk jaringan biologi. Ketentuan untuk mensterilkan produk alat kedokteran dengan cara iradiasi mengacu pada (ISO) 11737-1 (21). Produk sebelum diiradiasi harus diketahui bioburdennya yaitu jumlah populasi mikroba hidup (*viable*) yang terdapat pada produk tersebut.

Karena amnion yang diproses untuk graf amnion didapatkan dari donor yang berbeda, maka perlu dilakukan validasi tehnik pencucian, serta penentuan nilai bioburden yang sebenarnya dengan menentukan faktor koreksi bioburden menggunakan mikroba *B. pumilus* E 604 dan *E. coli*. Hasil percobaan untuk faktor koreksi dengan mikroba *B. pumilus* E 604 dan *E. coli* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah koloni mikroba *B. pumillus* E 601 dan *E. coli* hasil inokulasi pada amnion sebagai faktor koreksi bioburden

<i>Bacillus pumillus</i> E601		<i>E. coli</i>	
Kontrol	Ekstrak amnion (Wash1)	Kontrol	Ekstrak amnion (Wash 1)
2,94 x 10 ⁹	1,26 x 10 ⁹	4,20 x 10 ⁹	0,78 x 10 ⁹
3,18 x 10 ⁹	0,88 x 10 ⁹	4,22 x 10 ⁹	0,72 x 10 ⁹
2,81 x 10 ⁹	0,90 x 10 ⁹	4,09 x 10 ⁹	0,65 x 10 ⁹
Rataan = 2,98 x 10 ⁹	Rataan = 0,94 x 10 ⁹	Rataan = 4,21 x 10 ⁹	Rataan = 0,71 x 10 ⁹

Dari data tersebut didapat nilai faktor koreksi *B. pumillus* E604 dan *E. coli* berturut-turut adalah $2,98 \times 10^9 / 0,94 \times 10^9 = 3,17$ dibulatkan 3 dan $4,21 / 0,71 = 5,93$ dibulatkan 6.

Kandungan mikroba (bioburden) rata-rata graf amnion berukuran 5 cm x 5 cm perpaketnya dari lima donor adalah 10,4 sel (Tabel 3). Dari hasil tersebut didapat estimasi bioburden graf amnion $10,4 \times 3 = 31,2$ sel / paket atau 32 sel / paket.

Tabel 3. Kandungan mikroba (bioburden) graf amnion liofilisasi berukuran 5 x 5 cm dari lima donor.

Ulangan	Nomor Donor					Rata-rata kandungan mikroba (bioburden) dari lima donor adalah 10,4 sel per paket.
	I	II	III	IV	V	
1	20	7	5	6	8	
2	14	16	6	14	9	
3	9	9	14	13	20	
4	4	5	4	4	8	
5	6	4	9	9	18	
6	7	8	19	6	6	
7	5	20	17	10	16	
8	16	20	5	12	17	
9	5	10	18	9	5	
10	15	7	8	8	10	
Rataan	10,1	10,6	10,5	9,1	11,7	

Dosis sterilisasi yang digunakan untuk produk Bank Jaringan Riset Batan adalah 25 kGy. Dengan jumlah bioburden < 100 sel untuk setiap paketnya, dosis tersebut dapat diterima (ISO 13409) (22).

KESIMPULAN

Dari hasil validasi pencucian dan mikrobiologi graf amnion dapat disimpulkan bahwa:

1. Metode sembilan tahap pencucian jaringan amnion yang dikembangkan oleh Bank Jaringan Riset Batan dapat diterima.

2. ISO 11737-1 dapat digunakan sebagai standar penetapan bioburden pada proses sterilisasi graf amnion.
3. Dosis Sterilisasi 25 kGy dapat diterima untuk produk graf amnion.

DAFTAR PUSTAKA

1. DOUGLAS, B. Homografts of Foetal Membranes As A Covering for Large Wounds Especially Those from Burns, J. Tennessee Med. Assoc. 45 (1952) 230.
2. QUINBY, WC., HOOVER, HC., SCHEFFLAN, M. Clinical Trials of Amniotic Membranes in Burn Wound Care, Plast. Reconstr. Surg. 70 (1982) 711-716
3. GOEBEL, P. and SCHUBER, W. Personal Experiences With Covering Burns in Children with Amnion, Brit. Orthop. Traumatol. 37 (1990) 495-498.
4. ATANASSOV, W., MAZGALOVA, J., TODOROV, R., STEREVA, K., and TRENCHVA, W., Use of Amniotic Membranes as Biological Dressing in Contemporary Treatment of Burns, Ann. Medit. Burns Club-vol. VII No. 4-Dec. (1994).
5. COLOCHO, G., GRAHAM, WP., and GREENE, A.E., Human Amniotic Membrane as a Physiologic Wound Dressing, Arch. Surg. 109 (1974) 370-373.
6. BARD, DJ., BENNETT, JP., BURGOS, H. and FABRE, J., The Healing of Chronic Venous Ulcers with Prepared Human Amnion, Brit. J. Plast. Surg. 42 (1989) 463-467.
7. SHIMAZAKI, J., SHINOZAKI, N. and TSUBOTA, K., Transplantation of Amniotic Membrane and Limbal Autograft for Patients with Recurrent Pterygium Associated with Symblepharon, Br. J. Ophthalmol. 82 3 (1998) 235-240.
8. TSENG, SC., PRABHASAWAT, P., and LEE, SH., Amniotic Membrane Transplantation for Conjunctival Surface Reconstruction. Am. J. Ophthalmol. 124 6 (1997) 765-774.
9. PRABASAWAT, P., BARTON, K., BURKETT, G., and TSENG, S.C., Comparison of Conjunctival Autografts, Amniotic Membrane Grafts, and Primary Closure for Pterygium Excision. Ophthalmology. 104 6 (1997) 974-985.
10. MANJAS, M., ISMAL, and EFMANSYAH, D., Experience of Using Amniotic Membrane after Circumcision. Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN. (2002) 165-168.
11. MANJAS, M. and HELMI, H. Using Amniotic Membrane as Wound Covering after Cesarean Section Operation. Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN, (2002) 169-171.
12. TARUSARAYA, P. Pengalaman Pemakaian Amnion pada Penderita Kusta, CAIR-BATAN and IAEA Seminar on Tissue Banking, 19 Nov. 1998, Jakarta.
13. INDIRA, SLT., and BAMBANG, S., Freeze-Dried and Fresh Amniotic Membrane with Limbal Stem Cell Transplantation in Severe Conjunctival And Corneal Defect. 8th International Conference on Tissue Banking, 22-24 Oct. 2000, Bali.
14. ROBSON, MC. And KRIZEK, TJ. The Effects of Human Amniotic Membranes on The Bacterial Population of Infected Rat Burns, Ann. Surg. 2 (1973) 144-148.
15. ABBAS, B. and HILMY, N. Daya Hambat Amnion Liofilisasi Radiasi terhadap Pertumbuhan Beberapa Mikroba Patogen. Risalah Pertemuan Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN, 13-15 Des. (1994) 121-127.
16. ABBAS, B., HILMY, N., dan HARDININGSIH, L. Kombinasi Perlakuan Iradiasi dan Zat Kimia untuk Meningkatkan Sifat-Sifat Fisika Jaringan Amnion. Risalah Pertemuan Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN (1992) 54-62.
17. ANONYMOUS. Multi-Media Distance Learning Package on Tissue Banking-Modul 5, Processing. National University of Singapore, IAEA/NUS Regional Training Centre (RCA), IAEA/NUS Interregional Training Centre, Singapore (1997).

18. USP. The Pharmacopeia of the United States of America XIX. (1975) 767.
 19. OSOL, A. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania 18042 (1980) 1112.
 20. HILMY, N., ABBAS, B., and FEBRIDA, A., Validation of Radiation Sterilization Dose for Amnion and Bone Grafts, J. Cell and Tissue Banking Vol. 2, No. 2 (2001).
 21. ISO International Standard No. 11737-1, Sterilization of Medical Devices - Microbiological Methods Part 1: Estimation of population of microorganism on product. 1995.
 22. ISO International Standard No. 13409, Sterilization of Health Care Products - Radiation Sterilization - Substitution of 25 kGy as a Sterilization Dose for small or infrequent production batches (1996).
-