

The Difference between Total and Active Transforming Growth Factor β 2 Concentration on Fresh and Freeze-Dried Amnion Membrane (Laboratory Experimental Study in Dr. Soetomo General Hospital Surabaya)

Elisabeth Srisubekti, Diany Yogiantoro, Gatut Suhendro

Department of Ophthalmology

School of Medicine, Airlangga University/Dr. Soetomo General Hospital
Surabaya

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the change of Transforming Growth Factor β 2 (TGF- β 2) concentration due to freeze-dried method. This study was an experimental laboratory study, performed on 14 amniotic membranes at biomaterial centre/tissue banking Dr. Soetomo General Hospital Surabaya. Each amniotic membrane was divided into two parts. The first part was extracted in fresh and the second part underwent freeze-dried preparation before extracted. Both parts of the amniotic membrane were extracted using ultrasonic disintegrator. Concentration of TGF- β 2 with and without activation was measured using ELISA method. The average concentration of TGF- β 2 without activation (active) in fresh amniotic membrane was $274 \pm 264,9$ pg/g and freeze-dried was $76,1 \pm 97,6$ pg/g, the average degradation of TGF- β 2 was 43,2%. The average concentration of TGF- β 2 with activation (total) in fresh amniotic membrane was $445 \pm 855,6$ pg/g and freeze-dried was $347,4 \pm 665$ pg/g. Active TGF β 2 concentration in fresh amniotic membrane is significantly higher than TGF- β 2 concentration in freeze-dried amniotic membrane.

Keywords: freeze-dried amniotic membrane, TGF β 2, ELISA

Correspondence: Elisabeth Srisubekti, c/q: Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata, Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo 6-8 Surabaya 60286. E-Mail: elis_1406@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Membran amnion segar merupakan salah satu bentuk preparat membran amnion yang sering dilaporkan penggunaannya pada kelainan konjungtiva dan kornea di negara sedang berkembang. Belakangan ini transplantasi membran amnion bentuk segar dan preservasi, baik dalam bentuk *cryopreservation* maupun *freeze-dried*, secara terus menerus dikembangkan untuk berbagai indikasi oftalmologi serta mendapat perhatian karena merupakan metode yang efektif untuk rekonstruksi pada kelainan permukaan mata. Membran amnion mempunyai kemampuan yang unik termasuk mempermudah migrasi sel epitel, mengembalikan adhesi sel epitel basal dan mempermudah diferensiasi sel epitel.^{1,2,3}

Tahun 1940 Pertama kalinya De Rotth menggunakan membran amnion untuk bidang mata sebagai graft pada

defek konjungtiva pasca simblefaron. Kemudian Sorsby and Symons pada tahun 1946 menggunakan membran amnion untuk trauma kimia kaustik yang mengenai konjungtiva dan kornea. Tahun 1993 membran amnion mulai aktif digunakan kembali. Kim dan Tseng pertama kali melaporkan penggunaan membran amnion pada rekonstruksi permukaan kornea kelinci. Sejak itu membran amnion digunakan secara luas di bidang oftalmologi.^{1,4} Pada tahun 1997 Pinnita melakukan transplantasi membran amnion pada 84 mata dengan kelainan antara lain keratopati bullosa, herpes keratitis, defisiensi sel limbal pada sindroma Steven Johnson, luka bakar akibat zat kimia, defek epitel persisten, *band keratopathy* dan ulkus kornea dimana didapatkan keberhasilan 83,3%. Tahun 1998 Tseng menunjukkan bahwa transplantasi amnion saja bisa dilakukan pada rekonstruksi permukaan kornea yang disertai defisiensi sel induk limbal parsial.¹

Membran amnion *freeze-dried* merupakan bentuk yang steril dan dikeringbekukan dimana menurut beberapa penelitian membran amnion *freeze-dried* mempunyai sifat biologis dan morfologi yang sama. Yan-hong, 2007 melaporkan bahwa penggunaan membran amnion *freeze-dried* mempunyai keuntungan mudah didapat dan disimpan pada suhu ruang. Sterilisasi sinar γ membuat bentuk ini aman digunakan.^{5,6,7} Membran amnion segar penggunaannya sangat menguntungkan terutama di negara sedang berkembang karena mudah didapat, ketersediaannya hampir tak terbatas dan relatif murah. Di RSUD Dr. Soetomo penggunaan membran amnion sudah lama diaplikasikan oleh bedah mata. Departemen Ilmu Kesehatan Mata selama tahun 2007 telah menggunakan membran amnion pada 13 kasus di mana sebagian besar menggunakan preparat segar.

Transforming Growth Factor (TGF) merupakan salah satu bentuk protein yang disekresi oleh sel transformasi yang dapat merangsang pertumbuhan sel normal. TGF secara garis besar terbagi dalam 2 subfamili yakni TGF- α dan TGF- β . TGF- α merupakan substansi yang mirip dengan EGF sedangkan TGF- β justru sebaliknya. TGF- β terbagi dalam TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. TGF- β beserta reseptornya diproduksi oleh tiap sel tubuh termasuk epitel, endotel, hematopoetik, neural dan sel jaringan ikat. TGF- β meregulasi proliferasi dan diferensiasi sel, perkembangan embrional, penyembuhan luka dan angiogenesis. Pada sel kornea TGF- β 2 diekspresikan paling kuat dan mengindikasikan bahwa TGF- β 2 berperan penting pada sel kornea.^{8,9,10}

Mengingat pentingnya peran TGF β 2 pada kornea terutama pada proses penyembuhan luka dan karena faktor pertumbuhan tersebut terkandung pula pada membran amnion baik dalam bentuk segar maupun preservasia, maka penulis tertarik untuk meneliti sejauh mana perubahan konsentrasi TGF- β 2 yang terdapat pada membran amnion dalam bentuk segar dan *freeze-dried*.

Melalui penelitian ini dapat diketahui perubahan konsentrasi TGF- β 2 membran amnion segar dan *freeze-dried* sehingga dapat menjadi pertimbangan dalam pemilihan preparat membran amnion terbaik untuk menjaga konsentrasi TGF- β 2 untuk aplikasi klinis khususnya dibidang mata

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratoris dengan rancangan *one group pretest – post test design*. Dilakukan di RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan di laboratorium penelitian departemen Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya serta Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) Jakarta yang dimulai pada bulan Oktober 2008 sampai jumlah unit replikasi terpenuhi.

Membran amnion segar diambil dari ibu dengan persalinan seksio sesaria elektif dengan menggunakan instrumen dan teknik aseptik. Membran amnion dicuci

dengan salin yang berisi streptomisin 50 μ g/ml, penisillin 50 μ g/ml, selanjutnya bagian dalam dipisahkan secara tumpul dari korion. Setelah itu membran amnion direndam dalam BEM sebagai media transport dan disimpan pada suhu 4 derajat Celcius untuk kemudian dilakukan ekstraksi sebelum 24 jam.

Selanjutnya dikirim ke laboratorium dalam tabung steril dengan *dry-ice*. Membran amnion dikeringkan pada kertas pengering, kemudian dibagi dua bagian (bagian pertama untuk preparat segar dan bagian kedua untuk *freeze-dried*), masing-masing ditimbang berat basah dan diukur volumenya. Membran amnion untuk preparat segar dipotong-potong sekecil mungkin dan digerus dengan mortar steril sampai hancur, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse dan ditambahkan EDTA 2% dalam *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7,2 dengan volume yang sama. Membran amnion dihancurkan dengan *ultrasonic disintegrator* 16 amplitudo mikron berulang-ulang dengan *ice cold jacket*, setiap kali selama 3 menit istirahat selama 2 menit. Selanjutnya dilakukan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan kemudian diambil dan ditambahkan *polyethylene glycol* (PEG) 6000 8% selanjutnya dilakukan vibrasi untuk melarutkan PEG dan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 15 menit. Endapan yang terjadi dilarutkan kembali dalam PBS sampai volume jaringan sama dengan volume jaringan sebelum dilakukan proses ini, kemudian dilakukan vibrasi sampai larut untuk selanjutnya dilakukan asai TGF- β 2 dengan kit TGF- β 2.¹¹

Untuk membran amnion *freeze-dried*, membran amnion dibersihkan dan dicuci dengan antibiotik seperti di atas. Membran amnion dikeringkan pada kertas pengering, dan ditimbang berat basah serta diukur volumenya. Kemudian membran amnion dipindahkan ke dalam *deep-freezer* untuk persiapan proses *freeze-drying* selama 24-48 jam. Proses selanjutnya menuju ke proses *freeze-dryer* sampai pengeringannya optimal (selama 7-8 jam) untuk kemudian dilakukan pengepakan melalui *laminar air flow* dan dilakukan sterilisasi secara kimiawi dengan menggunakan radiasi sinar γ (25kGy). Setelah menjadi bentuk *freeze-dried* dikirim ke laboratorium Patologi Klinik untuk dilakukan proses ekstraksi seperti di atas.

TGF- β 2 yang terdapat dalam sampel atau standar akan mengikat antibodi monoklonal terhadap TGF- β 2 manusia yang dilapiskan pada sumuran. Setelah inkubasi sumuran dicuci dengan bufer pencuci. Penambahan antibodi terhadap TGF- β 2 yang berlabel biotin akan membentuk kompleks seperti tampak dalam gambar di atas. Setelah inkubasi dan pencucian, ditambahkan larutan streptavidin berlabel HRP. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu ruangan, kemudian dilakukan pencucian dari reagen yang tak terikat, lalu ditambahkan substrat dengan kromogen TMB. Setelah inkubasi (di tempat gelap), ditambahkan *stopping solution*, lalu dibaca dengan *micro-ELISA-reader* pada panjang gelombang λ 450 nm. Intensitas

warna yang terbentuk diukur absorbennya dan kadarnya ditentukan dengan menggunakan kurva baku yang dibuat dengan secara baku (Handojo, 2003).^{12,13,14} Kadar TGF- $\beta 2$ inaktif perlu diaktivasi untuk mendapatkan konsentrasi TGF- $\beta 2$ yang teraktivasi sehingga dapat menggambarkan konsentrasi dari TGF- $\beta 2$ total. Prosedur aktivasi TGF- $\beta 2$ adalah dengan menambahkan 25 μ l 1 N HCl ke dalam 125 μ l sampel, diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar dan ditambahkan 25 μ l 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES, Pemeriksaan asai dilakukan sebelum 2 jam.

Analisis data mengenai perubahan konsentrasi TGF- $\beta 2$ pada membran amnion segar dan *freeze-dried* menggunakan uji t 2 sampel berpasangan (*paired t test*) bila hasil uji normalitas data berdistribusi normal. Bila tidak berdistribusi normal maka akan menggunakan uji statistik non-parametrik *Wilcoxon signed ranks test*.

HASIL

Pengukuran konsentrasi TGF- $\beta 2$ dalam membran amnion aktif hanya dapat dilakukan pada 11 sampel saja. Hal ini dikarenakan volume 3 ekstrak sampel membran amnion tidak mencukupi untuk dilakukan uji ELISA.

Uji Normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov pada konsentrasi TGF- $\beta 2$ aktif pada membran amnion didapatkan bahwa kedua kelompok tersebut tidak berdistribusi normal, sehingga untuk uji statistik digunakan non- parametrik *Wilcoxon signed ranks test* dengan hasil $p = 0,0025$ (signifikansi pada $\alpha = 0,05$). Hasil uji statistik pada konsentrasi TGF- $\beta 2$ aktif pada membran amnion segar dan *freeze-dried* menunjukkan perbedaan bermakna. Konsentrasi TGF- $\beta 2$ aktif membran amnion segar lebih tinggi secara signifikan ($274 \pm 264,9$ pg/g) dibanding membran amnion *freeze-dried* ($76,1 \pm 97,6$ pg/g).

Data konsentrasi TGF- $\beta 2$ total pada membran amnion kelompok segar dan *freeze-dried* yang dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan hasil uji normalitas pada kedua kelompok membran amnion tidak berdistribusi normal, sehingga diperlukan uji statistik non-parametrik *Wilcoxon signed ranks test*.

Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi TGF- $\beta 2$ total pada membran amnion bentuk segar dan *freeze-dried* tidak mempunyai perbedaan yang bermakna ($p = 0,297$), maka dapat diartikan konsentrasi TGF- $\beta 2$ total pada membran amnion segar ($445 \pm 855,6$ pg/g) tidak lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan konsentrasinya pada membran amnion *freeze-dried* ($347,4 \pm 665$ pg/g).

PEMBAHASAN

Suatu penelitian eksperimental laboratoris memerlukan penilaian terhadap akuntabilitas suatu uji laboratorium tersebut. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan imunoasai maka diperlukan juga penilaian terhadap akuntabilitas imunoasai yang dipakai meliputi reliabilitas dan relevansinya. Pada penelitian ini pengukuran konsentrasi TGF- $\beta 2$ menggunakan metode ELISA dengan kit ELISA TGF- $\beta 2$ untuk manusia. Maka pada pembahasan penelitian ini selain membahas hasil penelitian akan dibahas juga metode penelitian yang digunakan meliputi metode ekstraksi dan uji ELISA.

Pada penelitian ini pemeriksaan TGF- $\beta 2$ dengan metode ELISA dilakukan pada membran amnion yang memerlukan perlakuan khusus sebelum diperiksa yakni melalui proses ekstraksi. Meskipun secara teknis lebih sulit tetapi protein jaringan setelah ekstraksi secara biologis lebih relevan dibanding bahan lain.

Tabel 1. Konsentrasi TGF- $\beta 2$ aktif pada membran amnion

Kondisi Membran Amnion	n	Konsentrasi TGF $\beta 2$ aktif				Uji statistik
		Mean	Simpangan baku	Minimal	Maksimal	
Segar	11	274	264,9	0	734,6	<i>Wilcoxon signed ranks test one tailed</i> $Z = -2,803$ $p = 0,0025$
<i>Freeze-dried</i>	11	76,1	97,6	0	327,4	

Tabel 2. Konsentrasi TGF- $\beta 2$ total pada membran amnion

Kondisi Membran Amnion	n	Konsentrasi TGF $\beta 2$ total				Uji statistik
		Mean	Simpangan baku	Minimal	Maksimal	
Segar	14	445	855,6	11,1	2996,5	<i>Wilcoxon signed ranks test one tailed</i> $Z = -0,534$ $p = 0,297$
<i>Freeze-dried</i>	14	347,4	665	996,5	2310,7	

Sampel membran amnion dimasukkan dalam BEM sebagai media transport untuk mempertahankan protein yang terkandung di dalamnya. Sebelum diekstraksi, dikeringkan dengan kertas penyaring kemudian diukur terlebih dahulu berat dan volume untuk nantinya hasil yang diperoleh akan dinyatakan ke pergram berat basah jaringan karena hasil dari pembacaan ELISA dari *human* TGF- β 2 Raybiotech picogram permililiter .

Proses ekstraksi pada penelitian ini mengikuti prosedur ekstraksi yang telah dilakukan oleh Gunawan, Suhendro dan Handojo, 2008 yang diawali dengan memotong-motong membran amnion sekecil mungkin untuk kemudian dihancurkan dengan mortar steril. Setelah itu ditambahkan larutan PBS pH 7.2 yang berisi EDTA 2% untuk membuat larutan tersebut bersuasana basa dan penambahan EDTA agar supaya tidak terjadi penggumpalan saat dihancurkan dengan *ultrasonic disintegrator*. Pada saat penggunaan *ultrasonic disintegrator* penelitian ini mengikuti syarat-syarat bahwa probe harus tenggelam pada saat proses ini dan bila akan mengulangi proses tersebut sampel kami getarkan dahulu dengan vortex. Proses tersebut dilakukan berulang-ulang, setiap kali 3 menit istirahat 2 menit bertujuan agar suhu tetap terjaga sekitar 4° Celsius sehingga protein yang ada tidak rusak. Hancurnya membran amnion pada penelitian ini dikendalikan mutunya dengan pemeriksaan hasil *ultrasonic disintegrator* di bawah mikroskop cahaya bahwa sel membran amnion setelah proses tersebut benar-benar hancur.

Setelah membran amnion hancur maka dilakukan ultrasentrifugasi untuk mendapatkan peptidanya. Peptida yang terdapat pada supernatan sampel diendapkan dengan penambahan PEG 6000, 8% untuk mengikat peptida. Endapan yang terjadi dilarutkan kembali dengan larutan PBS sampai volumenya sama dengan volume jaringan sebelum proses ekstraksi. Serangkaian proses di atas menunjukkan bahwa ekstraksi sampel untuk pemeriksaan imuno asai sitokin sangat *reliable*.

Uji imunoasai adalah imunoasai berlabel enzim pada antibody yakni uji ELISA dengan metode *double antibody sandwich streptavidine biotin test*. Adapun prinsip dasar dari metode ini menurut Handojo, 2002 adalah bahan pemeriksaan yang mengandung antigen direaksikan dengan antibody spesifik pertama yang terikat pada fase padat. Selanjutnya ditambahkan antibody spesifik kedua yang berlabel enzim. Akhirnya ditambahkan substrat dari enzim tersebut. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding lurus dengan kadar antigen dalam bahan pemeriksaan.

Keuntungan dari metode tersebut adalah bahwa uji ELISA ini memakai dua antibody monoklonal terhadap TGF- β 2 dan *streptavidine biotin* sebagai label enzim sehingga uji ini lebih spesifik, meskipun kurang sensitif bila dibanding dengan metode bioasai. Hasil yang didapat adalah benar-benar TGF- β 2 yang terdapat pada membran amnion sampel dan tidak dipengaruhi TGF lain.

Dalam setiap proses pengukuran selalu diperhitungkan mengenai keandalan (reliabilitas) dan validitas dari alat ukur dan pengukuran. Penting juga dipahami bahwa tidak

pernah ada satu pengukuran yang memiliki reliabilitas dan validitas sempurna. Untuk meningkatkan reliabilitas dan validitas pada uji ELISA penelitian ini kami menggunakan standarisasi cara pengukuran yang tercantum pada prosedur pemeriksaan asai TGF- β 2, alat yang kami pakai telah terkalibrasi.

Beberapa penelitian antara lain Koizumi (2000), Gomes (2001) telah membuktikan bahwa di dalam membran amnion terkandung beberapa faktor pertumbuhan antara lain TGF- β 2 yang berperan pada penyembuhan luka, khususnya di bidang mata untuk kelainan kornea dan konjungtiva. TGF- β merupakan sitokin yang berperan dalam mengawali dan mengakhiri perbaikan jaringan setelah trauma dengan meregulasi proliferasi, meningkatkan angiogenesis serta sebagai anti-inflamasi. Menurut penelitian yang dilakukan Imanishi, 2000 bahwa TGF- β 2 mRNA diekspresikan paling kuat di keratosit manusia dan endotel kornea. Berdasarkan besarnya peran dari TGF- β 2 terhadap proses penyembuhan luka kornea dan konjungtiva maka sangatlah relevan dipilih faktor pertumbuhan tersebut.

Adapun relevasinya terhadap sampel bahwa membran amnion banyak dilaporkan penggunaannya untuk berbagai indikasi pada kelainan kornea dan konjungtiva terutama di negara sedang berkembang. Adanya faktor-faktor pertumbuhan yang terkandung dalam membran amnion diduga ikut berperan pada proses penyembuhan luka pada kelainan kornea dan konjungtiva. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Pinnita (1999), Virender (2007), Patil (2006). Maka pada penelitian ini dipilih membran amnion sebagai sampel dimana faktor pertumbuhan dalam hal ini TGF- β 2 memang terdapat pada membran amnion.

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan konsentrasi TGF- β 2 aktif (tanpa aktivasi) pada membran amnion segar dan *freeze-dried* yang menunjukkan konsentrasi TGF- β 2 aktif pada membran amnion segar lebih tinggi dibanding membran amnion *freeze-dried*

DAFTAR PUSTAKA

1. Pinnita Prabhasawat, 1999. Application of Preserved Human Amniotic Membrane for Corneal Surface Reconstruction. Department of Ophthalmology. Mahidol University. Bangkok. pp 1–14.
2. Patil Amil, Billore, 2006. Amnion Membrane Transplantation A Fresh Tissue Experience. Rotary Eye Institut, Navsari Gujarat.
3. Virender Sangwan, Sanghamitra, Sushma, et al, 2007. Amniotic Membrane Transplantation: A Review of Current Indications in the Management of Ophthalmic Disorder pp 251-260 Taken from www.IndianJ Ophthalmol..Available on January 11, 2007.
4. Agrawal Vinay, 2000. Amniotic Membrane Transplantation: An Advance in Ocular Surface Disease Management. Clear Vision Eye Center. Ashoka. Mumbai, pp 157–158.
5. Addis Phillip, Hunt Charles, Dart John, 2000. Amniotic Membrane Grafts, Fresh or Frozen? A Clinical and in vitro comparison. Department of Biomedical Sciences. London. Taken from www.bjophthalmol.com, available on June 10, 2005.

6. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, et al, 2003. **Sterilized, Freeze-Dried Amniotic Membrane: A Useful Substrate for Ocular Surface Reconstruction.** Department of Ophthalmology, Kyoto, Japan. pp 93–99.
7. Yan-hong Chen, Hong-guang Cui, 2007. Amniotic Membrane Transplantation for Porous Sphere Orbital Implant Exposure. Department of Eye Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China. *Journal of Zhejiang University Science B*. pp 616–619.
8. Cohen Kelman, Diegelmann R, Lindblad W, 1992. *Wound Healing Biochemical and Clinical Aspects*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, pp 40–49, 71–124.
9. Imanishi J, Kamiyama, Iguchi et al, 2000. *Growth Factor Important in One Healing and Maintenance of Transparency of the Cornea.* Department of Microbiology. pp 114–127.
10. Gerard Blobe, Schiemann W, Lodish H, 2000. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. Vol. 342, number 18. Whitehead Institute for Biomedical Research. Taken from www.nejm.org, available on October 10, 2007.
11. Gunawan, Suhendro G, Handojo, 2008. Perbedaan Kadar *Epidermal Growth Factor* (EGF) pada Selaput Amnion tanpa Preservasi dan dengan *Cryopreservation*. Departemen Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran UNAIR/ RSUD dr Soetomo, Surabaya. pp 22–31.
12. Handojo I, 2003. *Pengantar Imunoasai Dasar*. Airlangga University Press. Surabaya. pp 97–171.
13. Sastroasmoro Sudigdo, Ismael Sofyan, 2002. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi ke-2. CV Sagung Seto. Jakarta. hal. 145–287.
14. Gomes Jose, MD, 2001. Amniotic Membrane Growth Factors may Explain Healing. *Ophthalmology Timer*. Sao Paulo, Brazil vol 26, Issue 7. January 04, 2001.