

## To Improve Stability of Factor VIII Using Minipool Cryoprecipitate Lyophilized for Hemophilia a Treatment in Indonesia

Saptuti Chunaeni<sup>1\*</sup>, Rahajuningsih Dharma Setiabudy<sup>2</sup>, Djajadiman Gatot<sup>3</sup>, Yuyun Siti Maryuningsih Soedarmono<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unit Transfusi Darah Pusat, Palang Merah Indonesia, Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

<sup>4</sup>Health Product Policy and Standards Department, World Health Organization, Jenewa, Swiss

\*Corresponding author: saptuti\_ch@yahoo.com

### Abstract

*Hemophilia is the most common hereditary bleeding disorder. Across Indonesia were around 2000 people suffering hemophilia. Replacement therapy to treat bleeding with F VIII concentrate, but still imported, expensive and not always available. As a substitute it can give Minipool Cryoprecipitate (MC), but it is liquid, must be stored at -30°C. To improve that MC stability, lyophilization was carried out to become dry MC. The aim of this research is To compare the stability and safety of dry MC and liquid MC. Made of liquid MC from 70 fresh frozen plasma. Then lyophilization was carried out to make MC dry, partly with the addition of excipients and some without excipients. The content of F VIII was checked on days 0, 7, 30 and 240 at 4°C and room temperature. Safety is assessed from hemagglutinin titers and bacterial contamination. The results shows that the content of F VIII in dry MC with excipients was lower than dry MC without excipients. F VIII on dry MC without excipients remained stable until day 30 at 4°C and room temperature. Addition of excipients caused lower F VIII content. Dry MC without excipients remained stable until day 30 at 4°C and room temperature.*

**Keywords :** *stability of factor VIII, Minipool cryoprecipitate*

### Abstrak

Hemofilia adalah kelainan perdarahan herediter paling sering ditemukan. Di Indonesia tercatat kurang lebih 2000 orang penderita hemofilia. Terapi sulih untuk mengatasi perdarahan, menggunakan konsentrat F VIII, tetapi masih impor, harganya mahal dan tidak selalu tersedia. Sebagai pengganti dapat diberikan *minipool cryoprecipitate* (MC), namun bentuknya cair sehingga harus disimpan dalam suhu - 30°C. Untuk meningkatkan stabilitasnya dilakukan liofilisasi menjadi MC kering. Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu membandingkan stabilitas dan keamanan MC kering dengan MC cair. Dibuat MC cair dari 70 kantong plasma segar beku. Kemudian diliofilisasi menjadi MC kering, sebagian ditambahkan eksipien dan sebagian tanpa eksipien. Kandungan F VIII diperiksa pada hari 0, 7, 30 dan 240 pada suhu 4°C dan suhu kamar. Keamanan dinilai dari titer hemagglutinin dan kontaminasi bakteri. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan F VIII pada MC kering ditambah eksipien lebih rendah dari MC kering tanpa eksipien. F VIII pada MC kering tanpa eksipien tetap stabil sampai hari 30 pada suhu 4°C maupun suhu kamar. Penambahan eksipien menyebabkan kandungan F VIII lebih rendah. MC kering tanpa eksipien tetap stabil sampai hari 30 pada suhu 4°C maupun suhu kamar.

**Kata Kunci :** *Stabilitas F VIII, Minipool cryoprecipitate kering*

## Pendahuluan

Hemofilia adalah kelainan koagulasi hereditas yang paling sering dijumpai. Ada dua jenis hemofilia, yaitu hemofilia A, karena kekurangan faktor VIII (F VIII) dan hemofilia B karena kekurangan faktor IX (F IX). Hemofilia A merupakan bentuk yang terbanyak dijumpai yaitu sebanyak 80-85% dan 10-15% sisanya adalah hemofilia B.<sup>1,2,3</sup> Hemofilia diturunkan secara X-linked recessive karena gen yang mengkode faktor VIII dan IX terletak pada ujung lengan panjang (q) kromosom X. Oleh karena itu, penderita hemofilia umumnya laki-laki, sedangkan perempuan sebagai pembawa sifat.<sup>1</sup> Setidaknya, satu orang diantara tiga individu dengan hemofilia berasal dari keluarga yang tidak memiliki riwayat hemofilia. Hal ini dapat terjadi karena adanya mutasi genetik pada tubuh janin.<sup>4</sup> Frekuensi hemofilia diperkirakan sebanyak 1 per 10.000 kelahiran bayi lelaki.<sup>1,2</sup> Angka ini tidak dipengaruhi oleh ras, letak geografis maupun kondisi sosioekonomik. Saat ini, jumlah penderita hemofilia di seluruh dunia diperkirakan ada 400.000 orang, namun sekitar 80% nya tidak mempunyai akses terhadap pengobatan.<sup>5</sup> Di Indonesia dengan jumlah penduduk sekitar 250 juta, diperkirakan jumlah penderita hemofilia ada 25.000, namun saat ini baru tercatat 2.000 orang. Data yang dikumpulkan oleh Tim Pelayanan Terpadu Hemofilia Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr. Cipto Mangunkusumo (RSCM) pada bulan Oktober 2018, tercatat total penderita hemofilia anak ada 197 orang yang berobat ke RSCM dengan 160 (81%) hemofilia A yang diantaranya 96 (60%) adalah anak yang menderita hemofilia A berat. Total penderita se Jabodetabek ada 403 anak hemofilia, 345 (86%) anak penderita hemofilia A yang diantaranya 185 (54%) merupakan penderita hemofilia A berat.<sup>6</sup>

Gejala perdarahan yang dapat dijumpai pada hemofilia adalah mudah memar, perdarahan yang lama setelah luka atau operasi dan gejala yang karakteristik, yaitu perdarahan spontan pada sendi (hemartrosis) atau hematoma di jaringan lunak.<sup>2,4,7</sup> Hemartrosis merupakan keluhan utama sekitar 70-80% kasus hemofilia yang datang dengan perdarahan akut<sup>7</sup> Perdarahan sendi yang terjadi berulang kali dapat menyebabkan jaringan sinovium lebih mudah mengalami perdarahan berulang dan pembengkakan.<sup>4</sup> Jika hemartrosis

terjadi berulang akan mengakibatkan artropati dan kecacatan yang menetap sehingga menurunkan produktivitas dan kualitas hidup serta masalah psikososial lainnya.<sup>7</sup> Berat ringannya perdarahan tergantung pada aktivitas faktor VIII atau IX. Pada hemofilia A berat (aktivitas F VIII kurang dari 1%), perdarahan sendi dan otot biasanya terjadi satu kali seminggu secara spontan, tanpa didahului trauma.<sup>8</sup> Pada sekitar 90% penyandang hemofilia berat, perdarahan sendi pertama kali terjadi pada usia kurang dari empat tahun, lebih dini dibandingkan perdarahan sendi pada hemofilia sedang dan ringan.<sup>9</sup> Pada hemofilia sedang, aktivitas faktor VIII atau IX berkisar antara 1-5%. Gejala meliputi kulit mudah memar, perdarahan di area sekitar sendi, kesemutan dan nyeri ringan pada lutut, siku dan pergelangan kaki. Sedangkan pada hemofilia ringan, aktivitas faktor VIII atau IX berkisar antara 5-30%. Gejala berupa perdarahan berkepanjangan baru muncul saat penderita mengalami luka atau pasca prosedur medis, seperti operasi. Perdarahan yang mengancam jiwa seperti perdarahan otak memerlukan penanganan segera.<sup>10,11,12</sup> Dalam waktu dua jam setelah perdarahan, penderita harus mendapatkan faktor pembekuan yang diperlukan.<sup>1</sup>

Perdarahan pada hemofilia, diatasi dengan cara memberikan *replacement therapy* (terapi sulih) berupa konsentrat F VIII atau F IX. Pengobatan utama hemofilia A adalah terapi sulih dengan konsentrat F VIII intravena atau transfusi kriopresipitat bila konsentrat tidak tersedia.<sup>1,5</sup> Saat ini konsentrat F VIII menjadi standar pengobatan *on demand*. Beberapa tantangan dijumpai pada terapi sulih F VIII dengan konsentrat bagi penyandang hemofilia A di Indonesia. Tantangannya adalah masih impor, harga mahal, tidak selalu tersedia di semua daerah dan dukungan pembiayaan dari pemerintah masih terbatas.<sup>12</sup>

Selain untuk pengobatan, konsentrat F VIII dan F IX juga diberikan untuk persiapan tindakan operasi ringan seperti cabut gigi atau sirkumsisi.<sup>1,12</sup> Konsentrat tersebut bisa berasal dari plasma atau dibuat secara rekombinan yang harganya mahal. Kebutuhan biaya operasi dan konsentrat F VIII cukup besar karena adanya kekerapan perdarahan sendi pada hemofilia A berat sekitar tiga hingga empat kali per bulan hingga menyebabkan lutut menjadi cacat dan

memerlukan tindakan operasi *joint replacement*.<sup>13</sup> Pembiayaan juga akan meningkat jika terbentuk inhibitor. Sekitar 30% dari penderita hemofilia A berat membentuk inhibitor terhadap faktor VIII, yaitu antibodi Imunoglobulin (Ig) G terhadap F VIII, sehingga memerlukan biaya yang lebih besar karena penderita tidak memberi respon terhadap dosis biasa.<sup>12,13</sup> Bila di Indonesia ditemukan semakin banyak jumlah dan bertambahnya usia penderita hemofilia serta semakin berat gejala perdarahannya, maka akan membutuhkan pengobatan seumur hidup yang akan memberatkan sistem jaminan kesehatan nasional di Indonesia. Oleh karena itu dapat dibayangkan betapa tinggi biaya pengobatan penderita hemofilia yang menjadi beban bagi keluarga, masyarakat maupun pemerintah. Selain menggunakan konsentrat faktor VIII atau IX, maka sebagai alternatif dapat menggunakan kriopresipitat yang mengandung F VIII untuk hemofilia A.<sup>1,14,15</sup> Kriopresipitat relatif lebih murah daripada konsentrat, namun kandungan Faktor VIII dan keamanannya belum memadai dibandingkan konsentrat. Selain itu kriopresipitat hanya bisa diberikan pada penderita yang golongan darahnya sama dengan pendonor.<sup>14,15,16</sup> Kriopresipitat selain mengandung F VIII dan Faktor *von Willebrand* (vWF), juga mengandung F XIII, fibrinogen, dan fibronektin sehingga kriopresipitat juga dapat digunakan untuk terapi sulih atau pencegahan perdarahan pada hemofilia A, penyakit *von Willebrand*, defisiensi F XIII, afibrinogenemia dan disfibrinogenemia.<sup>17</sup>

Masalah yang dihadapi oleh Unit Transfusi Darah (UTD) selain kandungan dan keamanan kriopresipitat yang belum memadai, adalah terbuangnya plasma sebagai limbah dalam jumlah banyak. Limbah plasma ini terjadi akibat pemanfaatan komponen PRC dan Trombosit yang lebih banyak dan belum terserapnya plasma untuk fraksionasi serta daya simpan UTD yang terbatas. Pembuangan limbah plasma pada tahun 2018 sekitar 60.000 liter, menghabiskan biaya pemusnahan lebih dari Rp. 6.000.000.000,- (enam milyar rupiah) per tahun.<sup>18</sup> UTD tidak perlu mengeluarkan biaya yang sangat besar untuk pemusnahan limbah plasma, jika limbah sisa plasma dimanfaatkan menjadi *Minipool Cryoprecipitate* (MC). Saat ini di UTD, kriopresipitat tersedia dalam satu kantong dengan volume 30- 40 mL dan kandungan F VIII 70-80

IU per kantong.<sup>15,16,19</sup> Adanya komplikasi risiko terpaparnya bakteri, virus dan reaksi imunologis, menyebabkan keamanan pada kriopresipitat perlu ditingkatkan.<sup>19</sup> Pada tahun 2010 di Mesir dikembangkan *Minipool Cryoprecipitate* (MC) untuk pengobatan hemofilia. Kelebihan dari MC ini adalah kandungan F VIII dan keamanannya lebih tinggi dari kriopresipitat.<sup>17</sup> Penggabungan 35 kantong kriopresipitat dari berbagai golongan darah ke dalam rangkaian kantong dalam *Viral Inactivation Pathogen System* (VIPS), yang diolah menjadi MC, tidak mempengaruhi kualitas kriopresipitat.<sup>20</sup> Bahkan kandungan MC cair ini dapat meningkat menjadi F VIII 250 IU per kantong, atau maksimal F VIII 500 IU per kantong.<sup>17,20</sup> Untuk meningkatkan keamanan MC, dilakukan inaktivasi patogen menggunakan *solvent-detergent* (S/D) yang dilengkapi dua mikrofilter, dimana satu filter mengandung *charcoal* dan filter standar sterilisasi lainnya berukuran 0,2  $\mu\text{m}$  (S/D-F).<sup>17,20</sup> Namun MC ini bentuknya cair sehingga stabilitasnya terbatas dan harus disimpan di *Freezer* pada suhu lebih rendah dari  $-20^{\circ}\text{C}$ , yaitu  $-30^{\circ}\text{C}$ .<sup>15,16,19</sup> Oleh karena Indonesia merupakan negara kepulauan dan pasien hemofilia bisa berasal dari daerah terpencil, maka uji stabilitas meliputi kandungan F VIII, pH dan osmolaritas serta kelarutan menjadi sangat penting. Jika MC cair diliofilisasi menjadi MC kering dengan penambahan eksipien, maka MC akan lebih stabil ketika disimpan dan didistribusikan di suhu *Blood Bank*  $2-8^{\circ}\text{C}$  atau  $> 25^{\circ}\text{C}$  untuk pasien yang berdomisili di daerah terpencil.<sup>21</sup> Juga dapat digunakan sebagai terapi sulih profilaksis di rumah (*home therapy*).<sup>4,5</sup>

Tujuan Penelitian secara Umum: membandingkan stabilitas dan keamanan MC kering dan MC cair. Tujuan Khusus: membuktikan adanya kesetaraan stabilitas faktor VIII antara penyimpanan MC kering pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$  dan  $> 25^{\circ}\text{C}$  dengan MC cair pada suhu  $-30^{\circ}\text{C}$ . Membuktikan adanya stabilitas faktor VIII yang lebih baik pada MC kering dengan eksipien daripada yang tanpa eksipien. Membuktikan bahwa keamanan MC kering sebanding dengan MC cair.

## Metode Penelitian

### Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium yang menggunakan kriopresipitat darah pendonor dan merupakan penelitian pra klinis. Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu tahap pertama merupakan penelitian tentang kandungan dan keamanan *minipool cryoprecipitate* S/D-F (MC) cair. Tahap kedua meneliti keamanan dan stabilitas *minipool cryoprecipitate* S/D-F (MC) kering dengan eksipien dan tanpa eksipien pada suhu penyimpanan yang berbeda. Kemudian membandingkan keamanan dan stabilitas MC cair dan MC kering tersebut. Penelitian ini meliputi bidang ilmu kedokteran transfusi dan hematologi.

### Waktu dan Tempat Penelitian

MC cair dan uji stabilitas dilakukan di Unit Transfusi Darah Pusat (UTDP), pembuatan FFP di Unit Transfusi Darah (UTD) DKI dan MC kering di PT. Bio Farma. Beberapa pemeriksaan dilakukan juga di beberapa tempat, yaitu pemeriksaan kandungan F VIII dan vWF di Lab. Patologi Klinik RSCM, Flowcytometri di Lab. Patologi Klinik RS Kanker Dharmais, Osmolalitas di Lab. Klinik RS Jantung Harapan Kita dan SEM di Dep. Metalurgi FT UI, Depok. Penelitian dilakukan sejak persiapan bulan September 2015 sampai dengan Juli 2019.

### Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari sejumlah 100 kantong whole blood/ WB atau darah lengkap dari kantong Triple Bag JMS, Singapura, 450 mL, meliputi berbagai golongan darah dari pendonor darah lengkap, sesuai kriteria inklusi dan eksklusi.

Sampel Penelitian berupa sampel MC cair dan MC kering. Berdasarkan kandungan F VIII yang lebih tinggi dipilih satu kantong besar VIPS Switzerland yang kemudian dibagi menjadi tujuh kantong *minipool cryoprecipitate* S/D-F cair, masing-masing volume 40-50 mL. Satu kantong untuk pengawasan mutu, enam kantong dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok satu berupa tiga kantong MC cair dan kelompok dua berupa tiga kantong MC cair yang diolah menjadi MC kering dengan alat Freeze Dry USIRFOID.

Sampel MC kering dengan eksipien/ KE+, berupa bubuk kering MC ukuran 2 x 0.5 x 0.5 cm di dalam botol 5 mL yang disimpan di suhu 2-8°C dan >25°C. Sedangkan MC kering tanpa eksipien/ KE-, berupa bubuk kering MC ukuran 2 x 0.5 x 0.5 cm di dalam botol 5 mL yang disimpan di suhu 2-8°C dan >25°C. Kedua sampel akan diperiksa kandungan F VIII, keamanan dan stabilitas

Kriteria Inklusi: Pendonor darah lengkap 450 mL dari donor darah sukarela, menandatangani informed consent, usia 18-60 tahun, laki-laki atau perempuan yang belum berkeluarga, sehat, berat badan minimal 55 kilogram, sudah mendonorkan darah minimal dua kali, teratur tiap tiga atau enam bulan, hasil uji saring infeksi menular lewat transfusi darah (IMLTD) dengan metode *chemiluminescence immuno assay* (CHLIA) dan *nucleic acid test* (NAT) dengan hasil non reaktif, profil plasma jernih, tidak lipemik, beku merata hingga inti dan setelah dicairkan selama sehari mulai mencair (*slushy*). Volume kriopresipitat banyak, kantong tidak bocor, tidak berubah warna, tidak berbau.

Kriteria Eksklusi: pendonor darah pengganti/bayaran, pendonor laki-laki, bertato dan atau bertindik, dikhawatirkan ada paparan infeksi dari jarum yang tidak steril, plasma kemerahan karena terkontaminasi sel darah merah, volume kriopresipitat tidak sesuai standar.

Perkiraan Besar Sampel diperoleh dari 100 orang pendonor sesuai inklusi untuk diambil darah lengkapnya menggunakan kantong Triple Bag JMS, Singapura, 450 mL. Setelah kantong darah yang hasil uji saring reaktif, lisis, bocor, berubah warna karena terkontaminasi bakteri, dibuang menjadi limbah infeksius, maka darah lengkap sesuai inklusi diolah menjadi Plasma Segar Beku (FFP). Sekitar 90% FFP yang beku sempurna dan tidak bocor, diolah menjadi kriopresipitat. Sekitar 70 % Kriopresipitat yang volumenya banyak, dipilih menjadi bahan awal pembuatan MC cair. Satu kantong besar VIPS-Switzerland mengandung 35 kantong kriopresipitat diolah menjadi satu kantong besar *minipool* S/D-F 450 mL yang dapat menghasilkan enam hingga tujuh sampel *minipool* kriopresipitat S/D-F cair dengan volume 40-50 mL atau 60-80 mL sesuai hasil pemeriksaan kandungan F VIII. Satu kantong *minipool* kriopresipitat S/D-F cair yang kandungan F VIII nya tinggi, diambil untuk

pemeriksaan kandungan dan keamanan F VIII sebagai T0. Tiga kantong disimpan di suhu  $-30^{\circ}\text{C}$  dan tiga kantong diliofilisasi. Kemudian *minipool* kriopresipitat S/D-F kering dipisah menjadi 2 bagian, satu bagian diisi eksipien dengan *stabilizer*, yang lain tanpa eksipien. Kemudian masing-masing disimpan di suhu berbeda untuk pemeriksaan kandungan, keamanan dan stabilitas.

### Cara Kerja

Prinsip liofilisasi digunakan untuk membuat *minipool cryoprecipitate* kering. Alat yang digunakan adalah timbangan elektrik *Centrifuge Balance*, Germany BPS, *plasma thawer* Germany BPS, alat untuk *freeze Dry* USIRFOID dan *strirer* untuk menghomogenkan campuran larutan. Reagen untuk eksipien (zat tambahan) yang digunakan, yaitu buffer glisin (berisi NaCl, Trisodium Sitrat, Glukosa, Glisin, dan air injeksi) dan formulasi (Polysorbate 80, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, Trisodium Sitrat, Sucrosa, Glisin, dan buffer glisin). Cairan yang digunakan adalah *sterile water*. Cara kerja dimulai dengan melakukan uji stabilitas menggunakan dua macam vial. Vial pertama diisi dengan formula bahan tambahan (eksipien), dihitung ukuran gram-nya untuk ditimbang. Kemudian dicampur menjadi larutan dan ditambahkan dengan buffer Glisin.

Prinsip pemeriksaan stabilitas pada MC kering dengan dan tanpa penambahan eksipien meliputi beberapa pemeriksaan yaitu pemeriksaan kandungan F VIII dan vWF; pH; Osmolalitas dan kelarutan. Alat yang digunakan adalah *Coagulometer Sysmex CS 5100*, pH *Mettler Toledo*, dan Osmometer Osmo1. Reagen yang digunakan sesuai alat dan SPO masing-masing. Cairan yang digunakan yaitu larutan wfi (*water for Injection*) Otsu WI dari Otsuka, Japan. Cara kerja dimulai dengan menyiapkan MC kering yang telah dilarutkan terlebih dahulu dengan dua mL larutan wfi Otsu WI (Eksipien dan tanpa Eksipien), dan masing-masing disimpan pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$  dan  $>25^{\circ}\text{C}$ . Sampel diambil dari dua kelompok yang beda suhu penyimpanannya. Dari tiap kelompok diambil sampel lagi yang ditambah eksipien dan yang tanpa eksipien. Pemeriksaan dilakukan dua kali. Kemudian dilakukan pemeriksaan stabilitas meliputi beberapa pemeriksaan yaitu pemeriksaan kandungan F VIII menggunakan alat *Sysmex CS 5100*, pemeriksaan

pH dengan pH meter dari *Mettler Toledo*, pemeriksaan Osmolalitas menggunakan osmometer Osmo otomatis. Pemeriksaan stabilitas meliputi:

Pemeriksaan F VIII dengan *Coagulometer Sysmex CS 5100* Prinsip pemeriksaan kadar F VIII menggunakan *Coagulometer Sysmex CS 5100* untuk mengetahui prosentase kadarnya. Tahapan yang dilakukan untuk pemeriksaan F VIII sesuai SPO dengan diawali validasi dan kalibrasi menggunakan reagen kalibratornya. Setelah nilainya masuk, maka setiap sampel dimasukkan ke *cuvet* untuk diperiksa secara otomatis.

Pemeriksaan pH dengan pH meter *Mettler Toledo* Prinsip pemeriksaan adalah pH dikatakan asam jika kurang dari pH standar (6,8-7,4), dikatakan basa jika melebihi angka standar. Pemeriksaan dengan *Mettler Toledo* yang berupa alat digital, ditujukan untuk menguji kadar pH. Tahap pertama adalah dengan melakukan kalibrasi internal, kemudian tambahkan elektroda pada cairan yang akan diuji. Selanjutnya, dengan menekan tombol *read*, alat akan menampilkan hasil uji kadar pH pada *display*.

Pemeriksaan Osmolalitas dengan Osmometer Osmo1, *Advanced Instrument*. Prinsip pemeriksaannya adalah jika viskositasnya baik, maka osmolalitas cairan tersebut baik, yaitu jika nilainya lebih dari 240 mOsmol/ kgH<sub>2</sub>O. Pemeriksaan Osmolalitas dilakukan melalui beberapa tahapan, hingga didapatkan hasil yang tampak di layar monitor alat.

Prinsip pemeriksaan kelarutan, pada tiap sampel botol diisi wfi (*water for Injection*) Otsu WI dari Otsuka, Japan 2 mL perlahan, dihomogenkan diputar dengan menghindari terbentuknya busa. Dikatakan kelarutannya baik, jika dalam waktu kurang dari 30 menit telah terbentuk larutan yang tidak berwarna atau agak kuning, jernih atau sedikit opalesen. Setelah 3 jam konstitusi tidak terbentuk koagulasi. Cara kerja pemeriksaan kelarutan dilakukan dengan melarutkan dua mL larutan wfi (Otsu WI) ke dalam vial dengan menggoyangkan secara perlahan. Perlu diperhatikan berapa lama waktu cairan menjadi larut sempurna. Selain itu, jika tidak ditemukan gumpalan atau serpihan, cairan juga dapat dikatakan telah larut sempurna.

Pemeriksaan Keamanan pada *Minipool Cryoprecipitate Kering* Untuk mengetahui

keamanan produk MC kering, akan diperiksa Hemagglutinin, antibodi A dan antibodi B secara manual dengan tabung reaksi menggunakan tes sel A dan tes sel B produk UTDP. Dikatakan aman jika titer anti A dan anti B tidak lebih dari 1/32. Selain itu juga diperiksa uji kontaminasi Bakteri dengan Bac T alert, Ensseval. Dikatakan baik jika setelah satu minggu diinkubasi, kuman aerob dan an aerob negatif, dengan melihat tidak adanya perubahan warna pada botol sampel. Manajemen dan Analisis Data Analisa data dilakukan secara bivariat untuk menentukan hubungan stabilitas kandungan F VIII dengan suhu dan lama penyimpanan kriopresipitat cair dan kering. Penelitian ini sudah lolos kaji etik, sesuai nomor 1194/UN2.F1/ETIK/2018 dari Komite etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

## Hasil dan Pembahasan

### Pembuatan MC Cair

Sampel FFP diperoleh dari 100 orang donor darah lengkap diolah menjadi 70 kantong kriopresipitat. Sebanyak 35 kantong kriopresipitat dari berbagai golongan darah diolah menjadi MC cair, didapatkan hasil pemeriksaan kandungan F VIII. Diambil MC cair yang hasil kandungan F VIII nya 7,4 IU/mL.

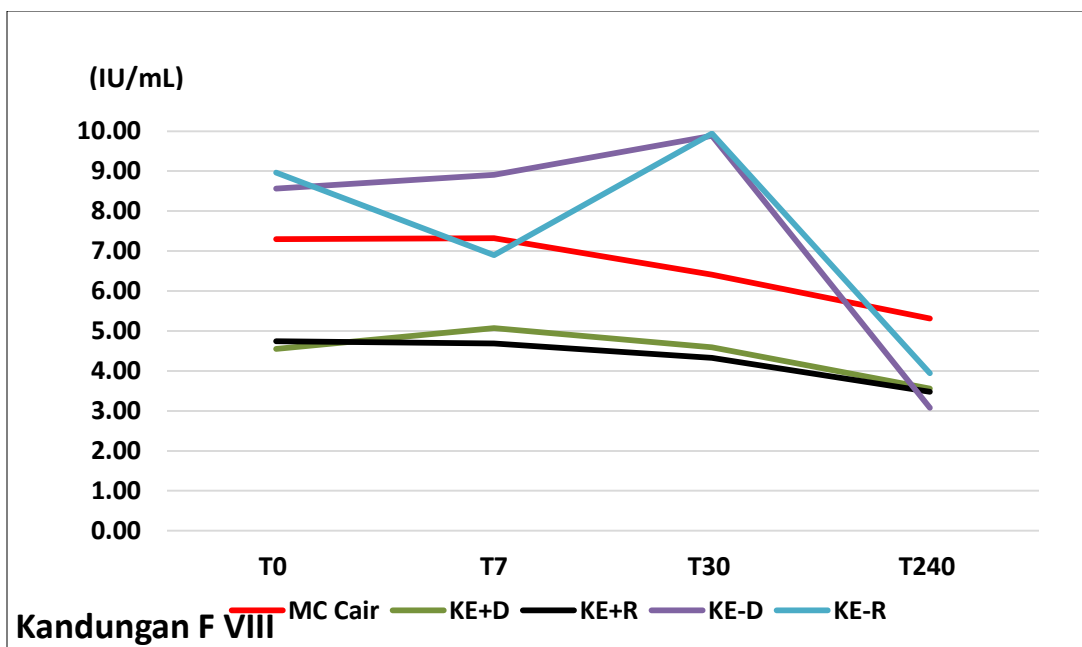
Pada MC cair dilakukan dengan melihat adanya sel darah merah dengan memeriksa *Glycoforin A*, sel darah putih dengan menghitung CD 45 dan keping darah/ trombosit dengan menghitung CD 61 menggunakan Flowcytometri. Hasil *White Blood Cells* (WBC) =  $0,01 \times 10^3 / \mu\text{L}$ , *Red Blood Cells* (RBC) =  $0,00 \times 10^6 / \mu\text{L}$ , *Platelet/ Trombosit* (PLT) =  $0 \times 10^3 / \mu\text{L}$ .

Pemeriksaan kontaminasi bakteri pada MC cair diperiksa dengan *Bac T alert*. Hasil pemeriksaan kontaminasi bakteri tidak didapati bakteri aerob dan an aerob. Pada pemeriksaan dengan Bac T Alert, MC kering yang telah dilarutkan, dimasukkan ke botol BPA dan BPN. Hasil pemeriksaan kontaminasi Bakteri aerob dan anaerob negatif.

Pemeriksaan hem agglutinin, menggunakan MC cair, MC kering dengan dan tanpa eksipien di suhu 2-8°C dan > 25°C didapatkan hasil penggumpalan dengan tes sel A dan B pada titer 1/2 , 1/4 dan 1/8. MC cair dan MC kering masih dikatakan aman karena titer hem agglutinin terhadap antibodi A dan B nya kurang dari 1/32.

Penambahan inaktivasi patogen dengan S-D/F: *Solvent-Detergent* yang berfungsi untuk menghancurkan membran lipid bakteri, virus yang beramplop dan sel darah. Adanya dua mikrofilter dalam VIPS (*Viral Inactivation Plasma System*) dapat menyaring sisa debris, sel darah dan bakteri serta virus sehingga keamanan plasma lebih terjamin. Untuk mengetahui kinerja S/D-F tersebut, maka dilakukan pemeriksaan adanya sel darah, adakah bakteri aerob dan an aerob serta adakah hemagglutinin pada MC cair dan MC kering.

Uji stabilitas kandungan F VIII pada MC kering dan MC cair dapat dilihat pada gambar 1. Dari grafik kandungan F VIII pada gambar 1 dapat disimpulkan bahwa kandungan F VIII MC cair pada suhu penyimpanan -30°C dan MC kering dengan dan tanpa eksipien pada suhu penyimpanan 2-8 °C dan >25°C sesuai lama penyimpanan adalah sebagai berikut: Semakin lama penyimpanan, kandungan F VIII MC cair semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, kandungan F VIII MC kering KE+D semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, kandungan F VIII MC kering KE+R semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, kandungan F VIII MC kering KE-D semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, kandungan F VIII MC kering KE-R semakin menurun. Dapat disimpulkan bahwa kandungan F VIII MC cair dan MC kering dengan dan tanpa eksipien pada suhu penyimpanan semakin lama disimpan akan semakin menurun.



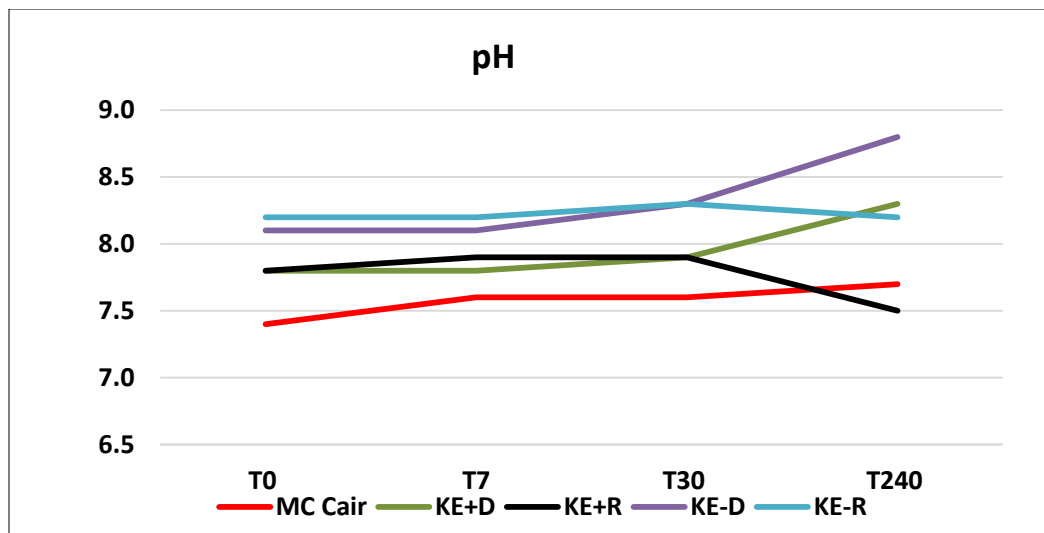
Gambar 1. Grafik Kandungan F VIII pada MC cair dan MC kering (KE+D, KE+R, KE-D, KE-R) sesuai lama penyimpanan (garis y: kandungan F VIII, x: lama penyimpanan)

Kandungan F VIII pada MC cair cukup stabil, walaupun semakin lama semakin turun karena tidak ada tambahan eksipien stabilizer. Penurunan F VIII masih dianggap baik karena penurunan kandungan VIII di bawah 50 %. Kandungan F VIII pada MC kering dengan eksipien, sejak awal kandungan F VIII nya kecil karena telah terencerkan oleh eksipien. Hal ini terjadi karena sebelum diberikan eksipien tidak dilakukan pemekatan hiperkonsentrasi menggunakan penyaringan ultra filter terlebih dahulu. Kandungan F VIII cukup stabil karena telah diberi eksipien yang menjaga dan menstabilkan kandungan F VIII. Penurunan MC kering masih dianggap baik karena MC kering dengan eksipien pada suhu dingin menurun 21,7 %, sedangkan MC kering dengan eksipien pada suhu kamar menurun 26,6 %.

Kandungan F VIII tanpa eksipien, tidak stabil karena tidak dilindungi eksipien sebagai

*stabilizer* F VIII. Awalnya, kandungan F VIII meningkat tinggi dibandingkan MC cair karena dengan proses beku kering telah terpekatkan, namun semakin lama penyimpanan, terjadi penurunan lebih dari 50 %.

Pemeriksaan pH pada MC kering dan MC cair, dapat dilihat pada gambar 2. Dari grafik pH pada gambar 2 dapat disimpulkan bahwa pH MC cair pada suhu penyimpanan  $-30^{\circ}\text{C}$  dan MC kering dengan dan tanpa eksipien pada suhu penyimpanan  $2-8^{\circ}\text{C}$  dan  $>25^{\circ}\text{C}$  sesuai lama penyimpanan adalah sebagai berikut: Semakin lama penyimpanan, pH MC cair semakin meningkat; Semakin lama penyimpanan, pH MC kering KE+D semakin meningkat; Semakin lama penyimpanan, pH MC kering KE+R semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, pH MC kering KE-D semakin meningkat; Semakin lama penyimpanan, pH MC kering KE-R semakin meningkat.



Gambar 2. Grafik Nilai pH pada MC cair dan MC kering (KE+D, KE+R, KE-D, KE-R) sesuai lama penyimpanan (garis y: nilai pH, x: lama penyimpanan (dalam hari)).

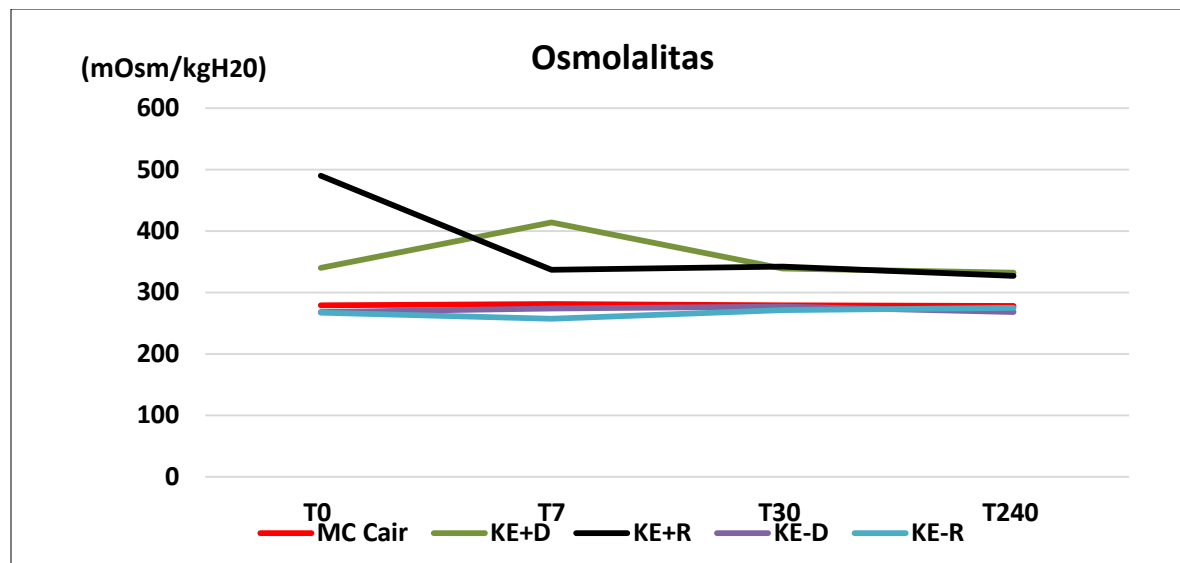
Peningkatan pH pada MC cair terjadi karena semakin lama penyimpanan, pH sedikit meningkat dalam batas normal. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya perubahan suhu pada saat mati lampu minggu kedua selama kurang lebih 3 jam sehingga suhu meningkat sekitar  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Peningkatan pH pada MC kering dengan eksipien terjadi karena adanya penambahan NaCl dan CaCl menyebabkan terjadinya perubahan menjadi basa. Namun setelah penyimpanan pada hari ke 30 terjadi perubahan pH. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya penggunaan larutan wfi yang mungkin sudah berubah kadar pH nya saat pengenceran, sehingga terjadi perubahan pola peningkatan dan penurunan pH pada penyimpanan setelah T 30. Sedangkan peningkatan pH pada MC kering tanpa eksipien terjadi karena tidak adanya Lioprotektan saat proses beku kering menyebabkan peningkatan pH hingga lebih dari 8. Namun setelah penyimpanan pada hari ke 30 terjadi perubahan pH. Hal ini mungkin karena penggunaan larutan wfi yang mungkin sudah berubah kadar pH nya saat pengenceran, sehingga

terjadi perubahan pola peningkatan dan penurunan pH pada penyimpanan setelah T 30.

Pemeriksaan osmolalitas pada MC kering dan MC cair, dapat dilihat pada gambar 3. Dari Grafik Osmolalitas tersebut dapat disimpulkan bahwa tingkat Osmolalitas MC cair pada suhu penyimpanan  $-30^{\circ}\text{C}$  dan MC kering dengan dan tanpa eksipien pada suhu penyimpanan  $2-8^{\circ}\text{C}$  dan  $>25^{\circ}\text{C}$  sesuai lama penyimpanan adalah sebagai berikut: Semakin lama penyimpanan, tingkat osmolalitas MC cair semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, tingkat osmolalitas MC kering KE+D semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, tingkat osmolalitas MC kering KE+R semakin menurun; Semakin lama penyimpanan, tingkat osmolalitas MC kering KE-D semakin meningkat; Semakin lama penyimpanan, tingkat osmolalitas MC kering KE-R semakin meningkat.





Gambar 3. Grafik Osmolalitas pada MC cair dan MC kering (KE+D, KE+R, KE-D, KE-R) sesuai lama penyimpanan (garis y: tingkat osmolalitas, x: lama penyimpanan (dalam hari)).

Tingkat osmolalitas pada MC cair dan MC kering tanpa excipien relatif stabil. Tingkat osmolalitas pada MC kering dengan excipien, meningkat karena pemeriksaan osmolalitas dinilai dari adanya Natrium, glukosa dan urea. Jadi penambahan excipien yang mengandung Natrium dari NaCl dan glukosa dari sukrosa dan bufer glisin menyebabkan terjadinya peningkatan osmolalitas.

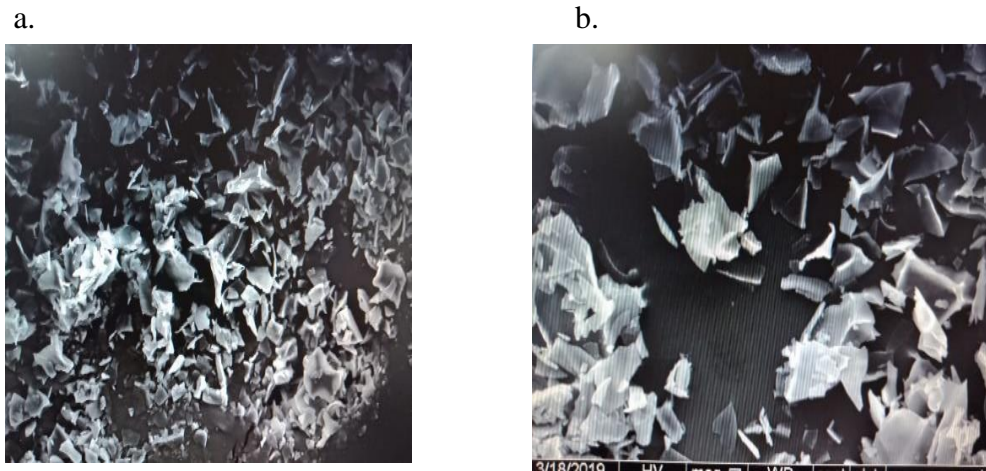
### Hasil Pemeriksaan Kelarutan

Pada semua jenis sampel MC kering, tidak ditemukan serpihan, keseluruhannya larut dengan baik di bawah 4 menit, jernih dan setelah 3 jam tidak ada gumpalan. Dari hasil pemeriksaan kelarutan MC kering pada suhu dingin dengan dan tanpa excipien, didapatkan kecepatan larut homogen sebagai berikut: KE+D = 1 menit 30 detik dan KE-D = 2 menit 15 detik. Dari hasil pemeriksaan kelarutan MC kering pada suhu ruang dengan dan tanpa excipien, didapatkan kecepatan larut homogen sebagai berikut: KE+R = 1 menit 45 detik dan KE-R = 59 detik.

Kelarutan bergantung pada berbagai kondisi, seperti suhu, konsentrasi bahan dalam larutan air dan komposisi pelarutnya. Kelarutan akan berkurang, sehingga memerlukan waktu lebih lama, jika terdapat komposisi pelarut yang sangat berlebihan. Umumnya kelarutan bertambah besar berbanding dengan kenaikan suhu. Semakin panas suhu penyimpanan, semakin cepat kelarutannya, hal ini tampak pada penyimpanan suhu ruang, lebih cepat larut dibandingkan dengan MC kering yang disimpan di suhu dingin. Untuk kelarutan pada sampel yang tanpa excipien lebih cepat larut daripada dengan excipien (KE-R 59 detik, KE+R 1 menit 45 detik). Pada kelarutan sampel dengan excipien suhu dingin dan suhu ruang hampir sama waktu kelarutannya (KE+D 1 menit 36 detik dan KE+R 1 menit 45 detik), namun pada sampel yang tanpa excipien di suhu dingin membutuhkan waktu yang agak lama (KE-D 2 menit 15 detik). Kelarutan dikatakan baik jika larut dalam waktu di bawah 30 menit dan tidak terbentuk koagulasi setelah 3 jam didiamkan.

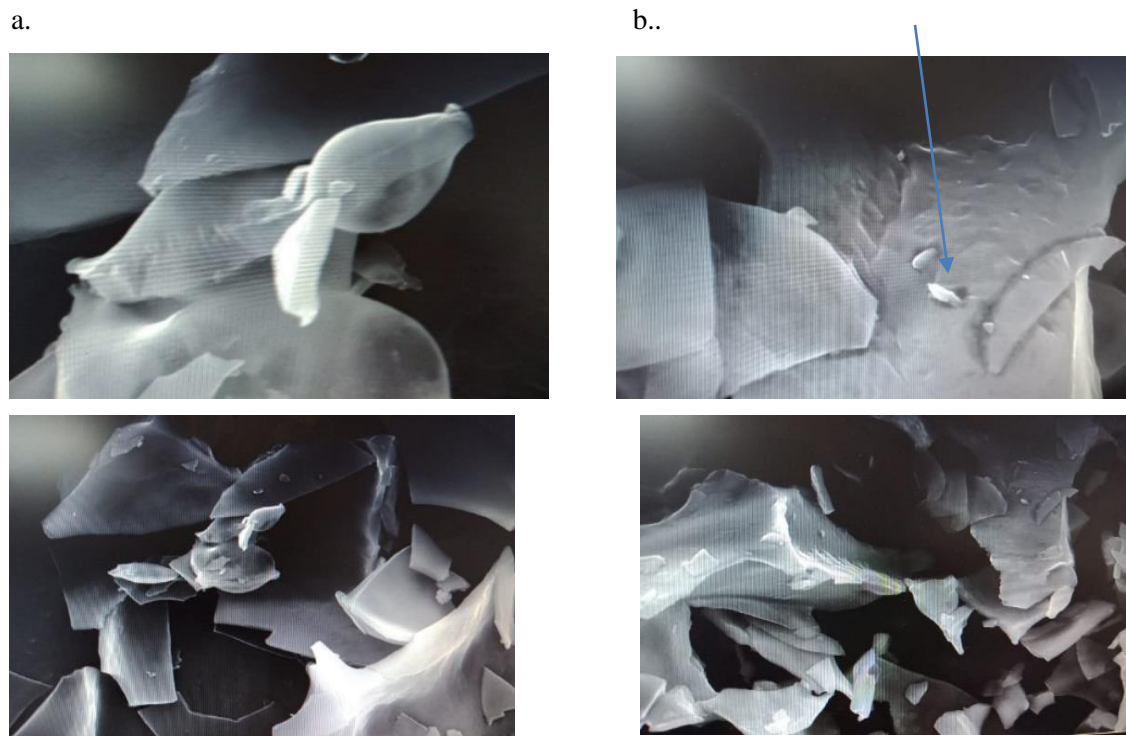
**Hasil Pemeriksaan SEM (*Scanning Electron Microscope*)**

Untuk mengetahui gambaran permukaan pada MC kering yang disimpan pada suhu ruang, dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 4. Hasil SEM: a. MC kering dengan Eksipien, gambaran SEM nya rapat, tampak banyak garam, kemungkinan dari buffer; b. Hasil SEM MC kering tanpa Eksipien gambaran SEM nya lebih renggang.

Gambar berikut memperlihatkan F VIII di ujung lembaran garam dari eksipien. Tampak F VIII seperti butiran beras.



Gambar 5. Hasil SEM: a. MC kering dengan Eksipien; b. Eksipien tanpa Eksipien tampak F VIII seperti butiran beras (tanda panah) yang menempel di tangkai lempengan garam

### Kesimpulan

MC kering lebih stabil daripada MC cair, hal ini terbukti dari proses penyimpanan pada hari ke 30 dan 240. Kelarutan MC kering dengan atau tanpa eksipien pada penyimpanan suhu 2-8°C dan suhu > 25°C sangat baik. Keamanan MC kering dilihat dari tidak adanya kontaminasi bakteri, besarnya titer aglutinin dengan titer anti A maupun anti B.

### Daftar Pustaka

- [1] Gatot D, Moeslichan MZ. Gangguan pembekuan darah yang diturunkan: hemofilia. Permono HB, Sutaryo, Ugrasena IDG, Windiastuti E, Abdulsalam M, penyunting. Buku ajar hematologi-onkologi anak. Jakarta: Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia; 2012. hal: 174 - 76.
- [2] Panduan Diagnosis & Tata Laksana Hemofilia; 2013.
- [3] Montgomery RR, Gill JC, Scott JP. Hemophilia and von Willebrand disease. Dalam: Nathan DG, Orkin SH, penyunting. Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood. Edisi ke-6. Tokyo: WB Saunders Company; 2003. p: 1631 - 69.
- [4] Friedman KD, Rodgers GM. Inherited coagulation disorders. Dalam: Greer JP, Foerster J, Lukens JM, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, penyunting. Wintrobe's clinical hematology. Edisi ke 11. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p: 1620 - 27.
- [5] Mariani E dan A Chozie Novie. Hemofilia Dalam Gambar. Cetakan keempat. Perhimpunan Hematologi dan Transfusi Darah Indonesia bekerjasama dengan Himpunan Masyarakat Hemofilia Indonesia, 2018;11.
- [6] World Federation of Hemophilia. Guidelines for The Management of Hemophilia. 2<sup>th</sup> ed;2012.
- [7] Himpunan Masyarakat Hemofilia Indonesia (HMHI). Gata registrasi, tidak dipublikasi. 2014.
- [8] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, KeyNS, Kitchen S. Treatment Guidelines Working Group on Behalf of The World Federation of Hemophilia: Guidelines for the management of hemophilia. Haemophilia;2013;19:1-47.
- [9] White GC, Rosendaal F, Aledort FM, Lusher JM, Rothchild C, Ingeslev J. Definitions in haemophilia: Recommendations of the Scientific Subcommittee of F VIII and F IX of the SSC of ISTH. Thromb Haemost; 2001;85:560.
- [10] van Dijk K, van der Bom JG, Lenting PJ, de GrootPG, Mauser-Bunschoten EP, Rosendaal G, et al. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A. Hematologica; 2005;90:494-8.
- [11] Kazazian Haig, Tuddenham Edward, Antonarakis. Hemophilia A: Deficiency of Coagulation Factor VIII. Scriver, Beaudet, Valle, Sly. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. International edition. Eight edition, volume II. p: 4367 – 4386.
- [12] Handryastuti, Djajadiman G, Arwin AP Akib. Clinical characteristics of hemophilia A patients with hemarthrosis. Pediatr Indones; 2002;42:131-7
- [13] Perhimpunan Hematologi dan Transfusi Darah Indonesia (PHTDI) dan Himpunan Masyarakat Hemofilia Indonesia (HMI). Panduan diagnosis dan tata laksana hemophilia. Edisi ke-1: Jakarta: PHTDI & HMHI;2013.h.1-31.
- [14] Data Biaya Tatalaksana Hemofilia di RSCM; 2016.
- [15] Kiswari R. Hematologi dan Transfusi. Penerbit Erlangga; 2014. h: 255 - 62.

- [16] Fung Mark K, Grossman Brenda J, Hillyer Christopher D, Westhoff Connie M. Technical Manual. aaBB. Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide. 18<sup>th</sup> Edition; 2014. p: 146 - 54.
- [17] Brecher Mark E, Hay Shauna, *LOOK IT UP! A Quick Reference in Transfusion Medicine*. 2<sup>nd</sup> Edition. AA BB Press. Bethesda, Maryland; 2012.
- [18] El-Ekiaby M, Sayed MA, Caron C, Burnouf S, et al. Solvent-detergent filtered (S/D-F) fresh frozen plasma and cryoprecipitate minipools prepared in a newly designed integral disposable processing bag system. *Transfusion Medicine*; 2010. p: 48 - 61.
- [19] Data Unit Transfusi Darah Pusat Palang Merah Indonesia; 2018.
- [20] The European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of BLOOD COMPONENTS. 18<sup>th</sup> Edition; 2015. p: 329-33.
- [21] El-Ekiaby M, Goubran HA, Radosevich M, Abd Alla, et al. Pharmacokinetic study of minipooled solvent/ detergent-filtered cryoprecipitate factor VIII. *Haemophilia*; 2011; 17: e884-c888.
- [22] Pikal, M, Tchessalov,S, Bjornson,E, Jameel,F, 2010. Factor VIII Formulations. WO 2010/054238 A; 1-52.