

PENENTUAN TINGKATAN JAMINAN STERILITAS PADA AUTOKLAF DENGAN INDIKATOR BIOLOGI *SPORE STRIP*

Insan Sunan Kurniawan Syah

Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
E-mail : insan.sunan.kurniawansyah@unpad.ac.id

ABSTRAK

Proses sterilisasi termal menggunakan uap jenuh di bawah tekanan berlangsung di suatu bejana yang disebut autoklaf, dan merupakan proses sterilisasi yang paling banyak dilakukan. Suatu siklus autoklaf yang ditetapkan dalam farmakope untuk media atau pereaksi adalah selama 15 menit pada suhu 121 °C kecuali dinyatakan lain. Autoklaf yang sederhana menggunakan sumber uap dari pemanasan air yang ditambahkan ke dalam autoklaf. Dengan autoklaf sederhana ini, tekanan dan temperatur diatur dengan jumlah panas dari api. Kelemahan autoklaf ini adalah bahwa perlu penjagaan dan pengaturan panas secara manual, selama masa sterilisasi dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan pengujian menggunakan indikator biologi *spore strip* terhadap proses sterilisasi dengan variasi waktu paparan berdasarkan nilai D. Dari hasil pengujian menunjukkan bahwa waktu paparan proses sterilisasi untuk mencapai Tingkat Jaminan Sterilitas dari autoklaf yang digunakan bisa dicapai dalam waktu 12 menit, yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan mikroorganisme pada media uji.

Kata kunci : autoklaf, indikator biologi, sterilisasi, tingkatan jaminan sterilitas.

ABSTRACT

Thermal sterilization process by saturated steam within pressure vessel usually termed an autoclave, and it was the most common sterilization process. The cycle of autoclave that determined at pharmacopeia for medium and product affording at temperature 121 °C for 15 minutes, unless other statement. The simple autoclave using steam source from boiling water that added to autoclave. With this simple autoclave, pressure and temperature set by amount of heat. Weakness from this autoclave that's need heat keeping and setting manually as long as sterilization process. This research was done by testing biological indicator spore strip at sterilization process with time variation according D value. The result showed that sterilization process cycle to reach Sterility Assurance Level (SAL) from used autoclave at 12 minutes, that indicated by no growth at test medium.

Keywords: autoclave, biological indicator, sterilization, sterility assurance level.

PENDAHULUAN

Mikroorganisme adalah suatu telaah mengenai organisme hidup yang berukuran mikroskopis. Dalam dunia mikroorganisme terdiri dari lima kelompok organisme, yaitu bakteri, protozoa, virus

serta algae dan cendawan mikroskopis.

Dalam mikroorganisme kita mempelajari banyak segi mengenai jasad-jasad renik ini (juga dinamakan mikroba atau protista), dimana adanya, ciri-cirinya, kekerabatan antara sesamanya seperti juga dengan

kelompok organisme lainnya, pengendaliannya dan peranannya dalam kesehatan serta kesejahteraan manusia. (Pelczar dan Chan, 2005)

Sediaan steril memiliki beberapa sifat bentuk takaran yang unik, seperti bebas dari mikroorganisme, pirogen dan bebas dari partikulat serta memiliki standar yang sangat tinggi dalam hal kemurnian dan kualitas. Tujuan utama pembuatan sediaan steril adalah mutlak tidak adanya kontaminasi mikroba. Kontaminasi dapat berasal dari beberapa penyebab sebagai berikut : sterilisasi media yang kurang sempurna, lingkungan kerja dan pelaksanaan cara kerja saat penanaman, eksplan, molekul-molekul atau benda-benda asing berukuran kecil yang jatuh atau masuk ke dalam botol kultur setelah penanaman dan ketika diletakkan di ruangan. (Agalloco and Carleton, 2008; Irby, 1994)

Tidak seperti syarat banyak sediaan yang lain, syarat sterilitas adalah nilai yang mutlak. Secara historis, pertimbangan sterilitas bersandar pada uji sterilitas

lengkap yang resmi, namun sediaan akhir pengujian sterilitas mengalami banyak batasan. Batasan yang paling nyata adalah sifat dasar dari uji sterilitas ini adalah uji yang destruktif sehingga hal ini tergantung pemilihan statistik sampel acak dari keseluruhan. Jika diketahui bahwa satu unit dari 1000 unit terkontaminasi (yakni, angka kontaminasi = 0,1%) dan 20 unit di sampel secara acak dari 1000 unit, kemungkinan unit yang terkontaminasi dari 20 sampel itu adalah 0,02. dengan kata lain, hanya 2% peluang dari unit yang terkontaminasi akan dipilih sebagai bagian 20 wakil sampel dari keseluruhan 1000 unit. Bahkan jika unit yang terkontaminasi satu dari 20 sampel dipilih untuk uji sterilitas, kemungkinan uji sterilitas akan gagal, masih ada untuk mendeteksi kontaminasi. Konsentrasi kontaminan mikroba mungkin saja terlalu rendah untuk terdeteksi selama periode inkubasi atau dapat saja tidak cukup berkembang cepat atau tidak sama sekali karena ketidakcukupan media dan inkubasi. (Abdou, 1974; Lukas, 2006)

Jika perkembangan mikroba terdeteksi dalam uji sterilitas, maka hal ini dapat mencerminkan pembacaan positif yang salah (*false-positive reading*) karena masalah kontaminasi aksidental dari media kultur pada saat uji sterilitas berlangsung. Masalah kontaminasi aksidental adalah hal serius, merupakan batasan yang masih tidak dapat dihindari dari uji sterilitas. *Food and Drug Administration* (FDA) menerbitkan pedoman mengenai prinsip umum dari proses validasi (Australian Government, 2006). Titik utama yang ditekankan pada pedoman adalah ketidakcukupan kepercayaan dari uji sterilitas sediaan akhir dalam memastikan sterilitas dari kumpulan sediaan steril. Batasan-batasan utama ini menunjukkan bahwa kepercayaan pada pengujian sterilitas produk akhir saja dalam memastikan sterilitas sediaan dapat mengarahkan kepada hasil yang keliru. Untuk memberikan jaminan yang lebih luas dan mendukung hasil dari uji sterilitas sediaan akhir, sebaiknya ruangan produksi steril harus memenuhi beberapa

persyaratan, diantaranya bebas mikroorganisme aktif. (Australian Government, 2006; Sandle, 2008)

Autoklaf adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan suhu 121 °C (250 °F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi² (15 Psi = 15 *pounds per square inch*). Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk 121 °C. (Marino and Benjamin, 1986)

Pada saat sumber panas dinyalakan, air dalam autoklaf lama kelamaan akan mendidih dan uap air yang terbentuk mendesak udara yang mengisi autoklaf. Setelah semua udara dalam autoklaf diganti dengan uap air, katup uap/udara ditutup sehingga tekanan udara dalam autoklaf naik. Pada saat tercapai tekanan dan suhu yang sesuai, maka proses sterilisasi dimulai dan *timer* mulai menghitung waktu mundur. Setelah proses

sterilisasi selesai, sumber panas dimatikan dan tekanan dibiarkan turun perlahan hingga mencapai 0 Psi. Autoklaf tidak boleh dibuka sebelum tekanan mencapai 0 Psi. (Marino and Benjamin, 1986; Lukas, 2006)

Untuk mendeteksi bahwa autoklaf bekerja dengan sempurna dapat digunakan mikroba penguji yang bersifat termofilik dan memiliki endospora yaitu *Bacillus stearothermophilus*, lazimnya mikroba ini tersedia secara komersial dalam bentuk *spore strip*. Kertas *spore strip* ini dimasukkan dalam autoklaf dan disterilkan. Setelah proses sterilisasi lalu ditumbuhkan pada media. Jika media tetap bening maka menunjukkan autoklaf telah bekerja dengan baik. (Capuccino and Natalie, 2000; Hugo and Russel, 1998)

BAHAN DAN METODE

Bahan : Alkohol 70% (Brataco®), *Aqua pro injectionum* bidestilata bebas pirogen (IPHA Pharma®), aquadest, karbol, indikator pH universal (Merck®), medium agar (Trypton Soy Broth dan Nutrient Agar) (Merck®), spiritus (Brataco®).

Alat : Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain autoklaf (All American®), inkubator (Memmert®), *Laminar Air Flow* (LAF) kabinet, lemari pendingin (Sharp®), timbangan analitik digital (Metler Todello®), indikator biologi (SGMStrip Dual Species™) dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di Laboratorium Teknologi dan Formulasi Sediaan Steril.

Metode penelitian :

Metode yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan tahapan sebagai berikut:

1. Penyiapan alat dan bahan.

Seluruh prosedur pengerjaan dilakukan didalam ruang *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% 1 jam sebelum pengerjaan dan disinari sinar UV selama 1 jam, lalu lantai ruangan percobaan dibersihkan dengan menggunakan desinfektan (karbol). Semua alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan dengan cara yang sesuai.

2. Sterilisasi Alat

Seluruh alat yang digunakan dibungkus menggunakan kertas perkamen kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah itu, alat kualitatif yang telah disterilisasi dimasukan ke dalam oven dengan suhu 150 °C selama 1 jam. (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995; Hagman, 2005)

3. Pembuatan medium uji

Pembuatan medium agar terdiri dari:

a. *Nutrient Agar* (NA)

Ditimbang 5,75 g NA, kemudian dilarutkan dengan 250 ml aquadest, lalu dididihkan sampai semua larut. Larutan agar disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. (Lukas, 2006)

b. *Trypticase Soy Broth* (TSB)

Ditimbang 7,5 gram TSB, kemudian dilarutkan dalam 250 ml aquadest, lalu dididihkan sampai semua larut. Larutan agar disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C, selama 15 menit. (Lukas, 2006)

4. Uji cemaran mikroba LAF (dengan metode Apus)

Secara aseptik (di meja dengan aliran udara laminar), batang apus steril dimasukkan ke dalam *aqua pro injectionum* bidestilata bebas pirogen. Semua bahan diatas dibawa ke ruang yang akan diuji cemaran mikrobanya. Dengan hati-hati batang apus diapus pada daerah seluas 25 cm². Batang apus kemudian diperas ke dalam cawan petri yang berisi cairan media NA, tutup cawan petri tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C, selama 18 - 24 jam. (Halls,1994)

5. Aplikasi indikator biologi dalam proses sterilisasi autoklaf

Prosedur aplikasi indikator biologi dalam proses sterilasi autoklaf yaitu :

a. Tempatkan tiga buah indikator biologi *spore strip* di dalam autoklaf untuk proses sterilisasi.

b. Lakukan proses sterilisasi dengan variasi waktu 9; 10,5; 12; 13,5 dan 15 menit (berdasarkan perhitungan *D-Value*).

- c. Setelah mengalami proses sterilisasi, pindahkan indikator biologi *spore strip* segera setelah autoklaf dingin. Lalu pindahkan indikator biologi *spore strip* ke ruang LAF untuk dilakukan uji pada media pertumbuhan.
- d. Di dalam ruang LAF; Menggunakan teknik aseptik yang benar dan sesuai sertifikat kelas 100, pindahkan masing-masing indikator biologi *spore strip* ke dalam tabung yang berisi medium pertumbuhan TSB.
- e. Inkubasikan indikator biologi *spore strip* di dalam TSB pada temperatur 55-60 °C selama tujuh hari.
- f. Jika spora bertahan selama proses sterilisasi, media pertumbuhan akan menjadi keruh dan gelap.
- g. Inkubasi indikator biologi *spore strip* dalam medium TSB tanpa perlakuan

pada temperatur 55-60 °C sebagai kontrol positif dan medium TSB steril sebagai kontrol negatif.

6. Pengamatan hasil
(McCauley, 2004)

HASIL

1. Uji cemaran mikroba LAF (dengan metode Apus)

Ruang LAF yang telah disterilkan kemudian diuji cemaran mikroba selama 30-48 jam pada suhu 37 °C. Dari hasil pemantauan diperoleh hasil bahwa ruang LAF steril, yang ditunjukkan dengan tidak ada pertumbuhan mikroba dalam cawan media pertumbuhan, seperti yang terlihat pada Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan ruang LAF

Cawan	Hasil
I	-
II	-

Keterangan :

+ : ada pertumbuhan mikroba

- : tidak ada pertumbuhan mikroba

2. Aplikasi Indikator Biologi dalam proses sterilisasi autoklaf

Tabel 4.2 Hasil pengamatan uji aplikasi indikator biologi dalam proses sterilisasi autoklaf dalam variasi waktu

No	Waktu Sterilisasi	Ind. Biologi	Hari Ke-						
			1	2	3	4	5	6	7
			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1	9'	Sampel 1	-	+	+	+	+	+	+
		Sampel 2	-	+	+	+	+	+	+
		Sampel 3	-	+	+	+	+	+	+
2	10,5'	Sampel 1	-	+	+	+	+	+	+
		Sampel 2	-	+	+	+	+	+	+
		Sampel 3	-	+	+	+	+	+	+
3	12'	Sampel 1	-	-	-	-	-	-	-
		Sampel 2	-	+	+	+	+	+	+
		Sampel 3	-	-	-	-	-	-	-
4	13,5'	Sampel 1	-	-	-	-	-	-	-
		Sampel 2	-	-	-	-	-	-	-
		Sampel 3	-	-	-	-	-	-	-
5	15'	Sampel 1	-	-	-	-	-	-	-
		Sampel 2	-	-	-	-	-	-	-
		Sampel 3	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : (+) = ada pertumbuhan mikroba

(-) = tidak ada pertumbuhan mikroba

medium TSB steril = kontrol negatif

medium TSB steril + indikator biologi tanpa perlakuan = kontrol positif

Aplikasi indikator biologi *spore*

strip yang dilakukan pada saat proses sterilisasi dengan berbagai variasi waktu berdasarkan nilai D, menghasilkan waktu yang efektif dengan autoklaf yang digunakan pada saat proses sterilisasi adalah 12 menit dengan suhu $\pm 125^{\circ}\text{C}$ dengan indikasi tidak terjadinya pertumbuhan mikroorganisme pada medium uji (TSB).

PEMBAHASAN

Ruang LAF yang merupakan ruangan produksi sediaan steril yang dikategorikan sebagai ruang kelas I atau *white area* yang harus memenuhi syarat jumlah mikroba dan partikel (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2006). Untuk memperoleh ruangan yang steril dan memenuhi persyaratan jumlah mikroba dan partikel, ruang LAF dibersihkan terlebih dahulu bagian dinding, lantai, dan langit-langitnya dari debu dan kotoran. Lalu bagian-bagian

tersebut dibersihkan dengan cairan disinfektan. Disinfektan yang digunakan yaitu alkohol 70 % dan fenol. Alkohol merupakan disinfektan dengan mekanisme kerja mendenaturasi protein dengan daya bunuh yang cepat tetapi mudah menguap dan terbakar, tidak bersifat sporoidal, dan perlu waktu kontak minimum 5 menit untuk mencapai tingkat disinfeksi. Sedangkan fenol memiliki mekanisme kerja dengan berpenetrasi terhadap dinding sel dan mengendapkan protein sel. Fenol memiliki spektrum yang luas sebagai disinfektan tetapi bersifat korosif terhadap karet dan sebagian plastik. Dengan menggunakan kedua disinfektan tersebut, ruang LAF sebagai ruangan produksi sediaan steril bebas dari mikroorganisme (Sandle, 2008).

Nilai D adalah waktu dalam menit yang dibutuhkan untuk mengurangi populasi mikroba sejumlah 90 % atau 1 log siklus (1/10 bagian yang hidup) pada suhu tertentu. Nilai D sering digunakan untuk menggambarkan keefektifan suatu proses sterilisasi. Dengan diketahui nilai D maka

waktu atau suhu yang diperlukan dalam sterilisasi akan diketahui. Pada sterilisasi *bioburden* digunakan bakteri *Bacillus stearothermophilus* sebagai indikator biologis karena merupakan mikroorganisme yang paling tahan panas pada sterilisasi uap panas. Adapun nilai D dari *Bacillus stearothermophilus* sebesar 1,5 menit (Hanida, 2006; McCauley, 2004).

Faktor suhu autoklaf yang dalam pengamatannya mencapai suhu 125 °C menyebabkan sterilisasi bisa dicapai dalam waktu 12 menit. Ini ditunjukkan dengan tidak ada pertumbuhan di dalam media uji TSB. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus stearothermophilus* yang berada di dalam indikator biologi *spore strip* telah mati. Sterilisasi media yang terlalu lama menyebabkan penguraian gula, degradasi vitamin dan asam-asam amino, inaktivasi sitokinin zeatin riboside dan perubahan pH yang berakibatkan depolimerisasi agar (Pelczar and Chan, 2005; Hugo and Russel, 1998)

Pada T = 12 menit sampel 2 terdapat endapan di atas permukaan media uji, ini bisa disebabkan oleh kontaminan yang masuk pada saat pengerjaan. Sedangkan pada sampel 1 dan 3 menunjukkan hasil negatif, yang berarti tidak ada pertumbuhan mikroba pada waktu 12 menit.

Autoklaf yang lebih komplit menggunakan sumber energi dari listrik. Alatnya dilengkapi dengan timer dan thermostat. Bila pengatur otomatis ini berjalan dengan baik. Maka autoklaf dapat dijalankan sambil mengerjakan pekerjaan lain. Kelemahannya adalah bila salah satu pengatur tidak bekerja, maka pekerjaan persiapan media menjadi sia-sia dan kemungkinan menyebabkan kerusakan total pada autoklaf. Sebagai sumber uap, juga berasal dari air yang ditambahkan ke dalam autoklaf dan dididihkan. Untuk autoklaf sederhana diperlukan beberapa proses validasi yang bisa menjamin kelayakan autoklaf itu. Salah satunya pengujian dengan menggunakan indikator biologi. Pengujian lain bisa dilakukan

dengan menggunakan indikator kimia ataupun indikator fisika (Irby, 1994)

DAFTAR PUSTAKA

- Abdou, M. 1974. Comparative study of seven media for sterility testing. *J Pharm Sci.* 63(5). 23-26.
- Agalloco, J and FJ Carleton. 2008. *Validation of Pharmaceutical Process*. Third Edition. New York: Informa. p. 1-4: 187-222
- Australian Government. 2006. *Therapeutic Good Administration Guidelines for Sterility Testing of Therapeutic Goods*. Australia: Department of Health and Ageing. p. 34-36.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2006. *Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik*. Jakarta: Badan POM RI. hal. 145-152.
- Capuccino, JG and S. Natalie. 2000. *Microbiology A Laboratory Manual*. California: Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. p. 139-148
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope*

- Indonesia. Edisi Keempat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hal. 9; 855; 1110-1114.
- Hagman, DE. 2005. Sterilization. In: *Remington; The Science and Practice of Pharmacy*. 21st Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. p. 776.
- Halls, NA. 1994. *Achieving Sterility in Medical and Pharmaceutical Products*. New York: Marcel Dekker. p. 82-86.
- Hanida. 2006. *Metode overkill dan bioburden*. Tersedia di: <http://www.depkes.go.id.html> [Diakses tanggal 14 April 2014].
- Hugo, WB and AD Russel. 1998. *Pharmaceutical Microbiology*. 6th Edition. London: Blackwell Science. p. 25-27.
- Irby, T. 1994. *Pembersihan, Sterilisasi dan Penyimpanan*. Tersedia di: <http://www.uaf.edu> [Diakses tanggal 16 April 2014]
- Lukas, S. 2006. *Formulasi Steril*. Yogyakarta: Penerbit Andi. hal. 9-14; 82-84; 86-99.
- Marino, FJ and F Benjamin. 1986. Industrial sterilization. In: Kenneth E. Avis, Leon Lachman, and Herbert A (editors). *Pharmaceutical Dossage Form: Parenteral Medications*. Vol 2. Marcel Dekker Inc. New York. p. 2-4.
- McCauley, K. 2004. *Product d-value studies: a critical tool when developing a sterilization process*. 1(3). Available at: www.sgmbiotech.com [Diakses tanggal 23 November 2014].
- Pelczar, MJ and ECS Chan. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press. hal. 131-135
- Sandle, T. 2008. *Environmental Monitoring in a Sterility Testing Isolator*. Available at: <http://www.pharmig.org.uk/pages/a>

[rticles/envmon.html](#) [Diakses

tanggal 16 April 2014