

**VALIDASI PENGUJIAN KADAR LIPID PADA *BULK* HBSAG VAKSIN  
HEPATITIS B DENGAN MENGGUNAKAN METODE KOLORIMETRI**

**Laporan Tugas Akhir**

**Ardi Zaenuri  
12161003**



**Universitas Bhakti Kencana  
Fakultas Farmasi  
Program Strata I Farmasi  
Bandung  
2020**

## LEMBAR PENGESAHAN

### VALIDASI PENGUJIAN KADAR LIPID PADA *BULK* HBSAG VAKSIN HEPATITIS B DENGAN MENGGUNAKAN METODE KOLORIMETRI

#### Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

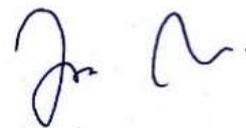
**Ardi Zaenuri**  
**12161003**

Bandung, Juli 2020

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(apt. Winnasih Rachmawati, M.Si.)

(Ira Adiyati Rum., M.Si)

## ABSTRAK

### VALIDASI PENGUJIAN KADAR LIPID PADA *BULK* HBSAG VAKSIN HEPATITIS B DENGAN MENGGUNAKAN METODE KOLORIMETRI

Oleh :

**Ardi Zaenuri**

**12161003**

Hepatitis B merupakan penyakit menular serius dan umumnya menginfeksi hati disebabkan oleh virus Hepatitis B (HBV) yang dapat menyebabkan penyakit akut maupun kronis. Upaya pencegahan terhadap penyakit Hepatitis B, salah satunya dengan vaksin yang harus dilakukan pengujian lipid. Pengujian lipid diperlukan untuk mendeteksi keberadaan kontaminasi khususnya lipid yang dapat berpengaruh pada spesifikasi kualitas dan mutu vaksin yang diatur sesuai regulasi standar *WHO* dengan batas maksimum tidak lebih dari 100 µg. Metodologi penelitian ini meliputi pembuatan reagen stock, pembuatan larutan standar soybean, pembuatan larutan standar QC, optimasi waktu suhu inkubasi, validasi metode analisis (kolorimetri), penetapan kadar sampel, dan pengolahan data hasil uji. Sampel yang ditambahkan pereaksi *ortho-phospho-vanillin* akan terbentuk reaksi warna berwarna merah muda setelah dilakukan pemanasan pada sampel, selanjutnya sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm pada Spektrofotometri *Visible*. Pada percobaan penetapan kadar lipid pada sampel *bulk* HbsAG, Penetapan Linieritas diperoleh  $R^2 = 0.9985$  dan diperoleh nilai  $v_{x0}$  sebesar 2 %, dengan Batas Deteksi sebesar 0,023150 mg/ml dan Batas Kuatisasi sebesar 0,070151 mg/ml. Perolehan kembali atau akurasi sebesar 93,66% - 108,05%. Dan % KV pada pengukuran secara presisi dari sampel FABH dan standar QC berturut turut sebesar 1,296 % dan 1,643 %. Pada penetapan kadar sampel didapat sebesar 24,57 µg dimana hasil dikatakan memenuhi syarat dan uji dapat digunakan sebagai pengujian rutin di PT Biofarma (Persero).

Kata Kunci : Hepatitis, lipid, kolorimetri, *Ortho-Phospo-Vanillin*, spektrofotometri, validasi.

## **VALIDATION OF LIPID LEVEL TESTING ON HBSAG BULK VACCINES HEPATITIS B USING COLORIMETRY METHOD**

### **ABSTRACT**

**By :**

**Ardi Zaenuri**

**12161003**

*Hepatitis B is a serious contagious disease and generally infects the liver caused by the hepatitis B virus (HBV) which can cause acute or chronic disease. Prevention efforts against hepatitis B, one of which is by vaccines that have to be tested for lipids. Lipid testing is needed to detect the presence of contamination, especially lipids that can affect the quality specifications and quality of vaccines that are regulated according to WHO standard regulations with a maximum limit of no more than 100 µg. The methodology of this research includes making stock reagents, making soybean standard solutions, making QC standard solutions, optimizing incubation temperature time, validating analytical methods (colorimetry), determining sample levels, and processing test data. Samples added by ortho-phospho-vanillin reagents will form a pink color reaction after heating the sample, then the sample is measured at a wavelength of 540 nm on Visible Spectrophotometry. In the determination of lipid levels in the HbsAG bulk sample, Linearity Determination was obtained  $R^2 = 0.9985$  and a  $vx0$  value of 2% was obtained, with a Detection Limit of 0.023150 mg / ml and a Strengthening Limit of 0.070151 mg / ml. Recovery or accuracy of 93.66% - 108.05%. And the% KV on precision measurements from FABH samples and QC standards were 1,296% and 1,643%, respectively. In determining the sample content obtained at 24.57 µg where the results are said to meet the requirements and the test can be used as routine testing at PT Biofarma (Persero).*

*Keywords: Hepatitis, lipids, colorimetry, Ortho-Phospho-Vanillin, spectrophotometry, validation.*

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW yang mengantarkan manusia dari zaman kegelapan ke zaman yang terang benderang ini. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi sebagian syarat-syarat guna mencapai gelar Sarjana Farmasi di Universitas Bhakti Kencana Bandung.

Dalam penyusunan skripsi ini banyak hambatan serta rintangan yang penulis hadapi, Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak dapat terselesaikan tanpa dukungan dari berbagai pihak baik moril maupun materil. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini terutama kepada:

1. Kedua orang tua, ayahanda tercinta H zenal Abidin dan ibunda tersayang Hj. Aisah yang telah memberikan dukungan baik moril maupun materil serta doa yang tiada henti-hentinya kepada penulis.
2. Ibu apt.Winnasih Rachmawati.,M.Si. selaku dosen Pembimbing I yang telah berkenan memberikan tambahan ilmu, bimbingan dan solusi pada setiap permasalahan atas kesulitan dalam penulisan skripsi ini.
3. Ibu Ira Adiyati Rum.,M.Si selaku dosen Pembimbing serta yang telah berkenan memberikan tambahan ilmu,bimbingan dan solusi pada setiap permasalahan atas kesulitan dalam penulisan skripsi ini.
4. Ibu Risma rachmawati.,M.Si, selaku pembimbing selama penelitian berlangsung di PT Biofarma (Persero) serta yang telah berkenan memberikan tambahan ilmu, bimbingan dan solusi pada setiap permasalahan atas kesulitan dalam penulisan skripsi ini.
5. Bapak Yusup dan Ibu Gilang selaku pihak Litbang PT Biofarma yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian di PT Biofarma (persero).
6. Ibu Kurnia Safitri yang telah mendukung dan menjadi perantara penelitian, sehingga penulis dapat melakukan penelitian di PT Biofarma (persero).

7. Seluruh teman dan karyawan PT Biofarma khususnya bagian QC, bagian Pengemasan, dan bagian Litbang yang telah memberikan dorongan, dukungan dan semangat bagi penulis.
8. Seluruh Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi yang telah memberikan pengetahuan yang sangat bermanfaat selama masa perkuliahan.
9. Ketua Prodi, Sekretaris jurusan, Dekan Fakultas farmasi, Seluruh staf dan karyawan Universitas Bhakti Kencana Bandung.
10. Segenap keluarga dan teman yang telah menyemangati dan membantu penyelesaian skripsi ini.
11. Seluruh teman-teman seangkatan, terutama kelas FA5 Angkatan 2016 yang selalu mengisi hari-hari menjadi sangat menyenangkan.
12. Agashinta Rizkianti, Anasthasya kasan dan Asep Rohimat selaku sahabat penulis yang tak pernah hentinya selalu memberikan semangat, dorongan, dan motivasi baik selama perjuangan masa kuliah ataupun selama masa penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna dikarenakan terbatasnya pengalaman dan pengetahuan yang dimiliki penulis juga karena masa pandemi covid19 ini banyak sekali rintangan dan hambatan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan segala bentuk saran serta masukan bahkan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan semua pihak khususnya dalam bidang ilmu pengetahuan dan bidang kesehatan.

Bandung, Juli 2020

Penulis,

(Ardi Zaenuri)

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
ABSTRAK .....	iii
<i>ABSTRACT</i> .....	ii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	ivi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
BAB I .....	1
PENDAHULUAN .....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Rumusan Masalah.....	2
I.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	3
I.4 Hipotesis .....	3
I.5 Tempat dan Waktu Penelitian .....	3
BAB II.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Hepatitis B.....	4
2.2 Vaksin dan Imunisasi.....	6
2.3 Bulk HbsAg (Hepatitis B <i>surface</i> Antigen).....	7
2.4 Pengujian Lipid dalam Bulk.....	8
2.4.1 Validasi Metode Analisis.....	11
2.4.2 Spektrofometri .....	11
2.4.3 Optimasi waktu suhu inkubasi .....	13
2.4.4 Validasi metode analisis .....	14
BAB III .....	19
METODOLOGI PENELITIAN.....	19
BAB IV.....	20
PROSEDUR.....	20
4.1 Persiapan Reagen Uji dan Larutan Standar.....	20
4.1.1 Pembuatan Reagen Stock .....	20
4.1.2 Pembuatan Larutan Standar (5mg/ml) .....	20
4.1.3 Persiapan Larutan QC (standar soy bean oil 0,225 (mg/ml) .....	20

<b>4.2 Optimasi waktu suhu inkubasi</b> .....	21
<b>4.3 Prosedur Validasi</b> .....	21
<b>4.3.1 Spesifitas</b> .....	21
<b>4.3.2 Linearitas</b> .....	21
<b>4.3.3 Sensitifitas</b> .....	22
<b>4.3.4 Akurasi</b> .....	23
<b>4.3.5 Presisi</b> .....	23
<b>4.4 Prosedur penetapan kadar lipid</b> .....	24
<b>BAB V</b> .....	25
<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	25
<b>5.1 Pembahasan</b> .....	25
<b>5.2 Hasil optimasi waktu suhu inkubasi</b> .....	25
<b>5.3 Hasil pengujian Spesifitas</b> .....	28
<b>5.4 Hasil pengujian linearitas</b> .....	29
<b>5.5 Hasil penetapan batas deteksi dan batas kuantisasi</b> .....	31
<b>5.6 Hasil pengujian akurasi</b> .....	32
<b>5.7 Hasil pengujian penetapan presisi</b> .....	33
<b>5.8 Hasil penetapan kadar sampel</b> .....	37
<b>BAB VI</b> .....	39
<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	39
<b>6.1 Kesimpulan</b> .....	39
<b>6.2 Saran</b> .....	39
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	40
<b>LAMPIRAN</b> .....	42

## DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Perolehan optimis waktu suhu inkubasi standar QC.....	27
Tabel 5.2	Rata-rata Absorbansi masing-masing konsentrasi.....	30
Tabel 5.3	Perolehan Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi.....	32
Tabel 5.4	Hasil Perhitungan % recovery.....	33
Tabel 5.5	Hasil Pengukuran sampel bulk FABH secara persis.....	34
Tabel 5.6	Hasil Uji Statistik <i>oneway anova</i> Presisi.....	35
Tabel 5.7	Hasil Pengukuran Standar QC Secara Presisi.....	36
Tabel 5.8	Hasil Uji Statistik <i>oneway anova</i> Presisi.....	37
Tabel 5.9	Pengolahan data penetapan kadar sampel.....	37

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Hepatitis B Virion</i> .....	5
Gambar 2.2	urutan reaksi sulfo-phospo-vanillin.....	9
Gambar 2.3	Spektrofotometri <i>UV-Vis</i> .....	12
Gambar 5.1	Grafik Optimasi waktu suhu inkobasi.....	27
Gambar 5.2	Spektrum larutan blanko dengan reagen <i>ortho-phosfo-vanillin</i> ...	28
Gambar 5.3	Spektrum larutan sampel FABH.....	29
Gambar 5.4	Gambar Kurva Kalibrasi Standar soybean oil.....	31

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pengolahan Data optimasi waktu inkubasi.....	42
Lampiran 2	Pengolahan data parameter linearitas.....	44
Lampiran 3	Pengolahan data parameter BDBK.....	46
Lampiran 4	Pengolahan data parameter Akurasi.....	48
Lampiran 5	Pengolahan data parameter Presisi.....	50
Lampiran 6	Pengolahan data dan perhitungan penetapan kadar sampel.....	52
Lampiran 7	Dokumentasi.....	53

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hepatitis B masih merupakan permasalahan kesehatan serius di dunia termasuk Indonesia. Salah satu resolusi yang diajukan oleh Indonesia pada sidang *World Health Assembly* 2010, adalah penetapan hari Hepatitis sedunia dengan aksi pencegahan dan eliminasi virus Hepatitis B salah satu upayanya melalui vaksinasi Hepatitis B. Walaupun vaksinasi Hepatitis B sudah menjadi program Imunisasi nasional dan telah berhasil menurunkan angka prevalensi Hepatitis B, *bulk* vaksin masih diimpor dari luar negeri. Dalam rangka kemandirian bangsa dalam penyediaan vaksin, maka dipandang perlu usaha dalam penguasaan teknologi produksi vaksin Hepatitis B yang merupakan vaksin rekombinan subunit protein antigen Hepatitis B (HBsAg) dan pada saat ini sedang dilakukan pengembangan dan sedang tahap pengujian untuk *bulk* vaksin tersebut.

PT Bio Farma yang merupakan perusahaan kelas dunia menyatakan bahwa produk vaksin Hepatitis B belum menggunakan vaksin yang diproduksi di Indonesia dan teknologi vaksin Hepatitis B terkini masih sangat tergantung pada negara lain. Biaya *royalty* dari *seed* vaksin dan teknologi vaksin ini relatif tinggi. Padahal Vaksin ini merupakan kebutuhan nasional sesuai dengan inisiatif pemerintah untuk melenyapkan Hepatitis B dalam program Indonesia Sehat 2010 dalam kebutuhan imunisasi (Nurainy *et al.*, 2012).

Dalam memperoleh kualitas dan mutu vaksin yang baik tentunya harus dilakukan beberapa pengujian salah satunya yaitu pengujian lipid. Pengujian lipid ini merupakan pengujian baru yang akan dilakukan oleh PT.Bio Farma. Pengujian lipid ini diperlukan untuk mengetahui keberadaan kontaminasi yang dapat berpengaruh pada spesifikasi kualitas dan mutu vaksin yang diatur sesuai regulasi standar *WHO* dengan batas maksimum tidak lebih dari 100 µg. Dan juga memungkinkan adanya residu dari ragi *hansenula polimorfa* yaitu ragi yang digunakan dalam pembuatan bulk tetapi secara alami ragi ini tidak dapat menghasilkan protein HbsAG melainkan virus itu sendiri, maka dilakukan rekayasa genetika (DNA).

Kemudian agar uji ini *kompatibel* untuk proses analisis ini sehingga dapat menjadi pengujian yang rutin maka harus dilakukan validasi, karena validasi merupakan hal yang penting sebagai sistem dalam kontrol kualitas dalam analisis di laboratorium. Parameter analitik untuk memvalidasi metode meliputi : Selektifitas, linearitas, sensitifitas, presisi, dan akurasi yang sesuai dengan regulasi WHO. (Technical, Series, Technical, & Series, n.d.)

Pada penetapan kadar lipid total dapat dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis, dimana metode ini merupakan metode kuantitatif yang memiliki selektifitas yang tinggi, aman dan pengerjaan yang sederhana dengan prinsip kerja yang didasarkan pada fenomena penyerapan sinar pada daerah sinar ultraviolet maupun sinar tampak. Sampel HBsAG memiliki bentuk fisik larutan tidak berwarna, sehingga sangat memungkinkan untuk dipilih metode kolorimetri pada penetapan kadar lipid yaitu dengan melakukan reaksi warna. Sampel yang ditambahkan pereaksi *ortho -phospho-vanillin* akan terbentuk reaksi warna berwarna merah muda setelah dilakukan pemanasan pada sampel, selanjutnya sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm pada Spektrofotometri *Visible*. (Suryadi dkk, 2010).

Dari latar belakang di atas, maka permasalahan yang muncul dapat dirumuskan sebagai berikut yaitu apakah metode kolorimetri dapat menghasilkan hasil yang valid dalam pengukuran kadar lipid pada sampel *bulk* HBsAG serta menentukan konsentrasi lipid dalam sampel HBsAG.

## **1.2 Rumusan masalah**

- a. Apakah metode kolorimetri dapat menghasilkan hasil yang valid dalam pengukuran kadar lipid pada sample *bulk* HbsAG berdasarkan parameter pengujian?
- b. Berapakah konsentrasi lipid total dalam bulk HbsAG yang telah dimurnikan?

### **1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian**

- a. Mendapatkan metode penetapan kadar lipid total dalam *bulk* HbsAg yang memenuhi kriteria validasi sehingga dapat digunakan untuk pengujian lipid pada sampel *bulk* HBsAG sebagai pengujian rutin
- b. Mendapatkan kadar lipid total dalam *bulk* HbsAg yang telah dimurnikan dengan memperhatikan aspek mutu, lingkungan dan K3

### **1.4 Hipotesis**

Penetapan kadar lipid dengan menggunakan metode kolorimetri pada *bulk* HbsAg yang telah memenuhi kriteria validasi merupakan metode yang selektif dan tepat.

### **1.5 Waktu dan tempat penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Juni 2020 di laboratorium PMKF (Pengujian Mutu Kimia dan Fisika) PT Biofarma Jl. Pasteur No.28.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

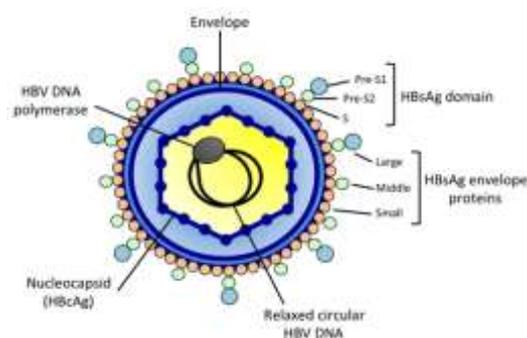
#### **2.1 Hepatitis B**

Hepatitis B merupakan penyakit menular serius dan umumnya menginfeksi hati disebabkan oleh virus Hepatitis B (HBV) yang dapat menyebabkan penyakit akut maupun kronis (1-3). HBV mengancam jutaan orang di dunia dan telah menginfeksi sekitar 1,2 juta orang di Amerika Serikat dan 2 milyar orang di dunia, dengan sekitar 240 juta orang mengidap Hepatitis B kronik. Kebanyakan orang tidak menyadari telah terinfeksi. Lebih dari 686.000 orang meninggal setiap tahun akibat komplikasi dari Hepatitis B, termasuk sirosis dan kanker hati (3-6). HBV telah menjadi penyakit endemis di berbagai negara di dunia. Indonesia merupakan negara dengan endemisitas Hepatitis B tinggi, tercatat Indonesia merupakan negara terbesar kedua di *South East Asian Region* (SEAR) setelah Myanmar. Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007 menunjukkan prevalensi Hepatitis B sebesar 9,4%. Ini berarti 1 dari 10 penduduk Indonesia pernah terinfeksi Hepatitis B. Bila dikonversikan dengan jumlah penduduk Indonesia maka jumlah penderita Hepatitis B mencapai 23 juta orang. Hasil Riskesdas 2013 menyatakan jenis Hepatitis yang banyak menginfeksi penduduk Indonesia adalah Hepatitis B (21,8 %). Besaran masalah tersebut akan berdampak besar terhadap masalah kesehatan masyarakat, produktivitas, umur harapan hidup, dan dampak sosial ekonomi lain (Ahmad & Kusnanto, 2017)

Hepatitis B disebut penyakit inflamasi dan nekrosis dari sel-sel hati yang disebabkan oleh virus hepatitis B. Virus hepatitis B merupakan jenis virus DNA untai ganda, family hepadna virus dengan ukuran sekitar 42 nm yang terdiri dari 7 nm lapisan luar yang tipis dan 27 nm inti di dalamnya. Masa inkubasi virus ini antara 30-180 hari rata-rata 70 hari. Virus hepatitis B dapat tetap infeksiif ketika disimpan pada 30-32°C selama paling sedikit 6 bulan dan ketika dibekukan pada suhu -15°C dalam 15 tahun (WHO, 2002). Virus HBV adalah virus DNA berukuran kecil dan termasuk dalam kelompok hepadna virus. Virus HBV terdiri atas nukleokapsid dan envelop luar yang terutama mengandung tiga antigen permukaan hepatitis B (HBsAg) yang berperan dalam diagnosis infeksi HBV. Nukleokapsid mengandung antigen core hepatitis B (HBcAg), reverse transcriptase, genom virus dan protein sel. Genom

terdiri atas molekul DNA sirkular berukuran 3200 pasangan basa (pb). Gen S mengkode tiga antigen yaitu pre-S1/ pre-S2/dan S, yang merupakan variasi HbsAg (Sam, & Manado, 2014)

Virus ini memiliki tiga antigen spesifik, yaitu antigen surface, envelope, dan core. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) merupakan kompleks antigen yang ditemukan pada permukaan VHB, dahulu disebut dengan Australia (Au) antigen atau hepatitis associated antigen (HAA). Adanya antigen ini menunjukkan infeksi akut atau karier kronis yaitu lebih dari 6 bulan. (Navas *et al.*, 2005)



Gambar 2.1 *Hepatitis B Virion*

(<http://www.antimicrobe.org/v22.asp>, Diakses tanggal 6/11/2019)

Vaksin Hepatitis B dibuat dengan teknologi vaksin rekombinan, yaitu dengan *Cloning* HBsAg berdasarkan informasi sekuens dari isolat asli Indonesia pada vektor ekspresi yeast *H. Polymorpha* yaitu dilakukan rekayasa genetika dengan cara mengambil material genetika (DNA) nya kemudian dimasukkan ke ragi *hansenula polimorfa* hingga menghasilkan HbsAg karena secara alami ragi ini tidak mampu menghasilkan protein HBsAg. Dalam pembuatannya alasan digunakan ragi tersebut adalah ragi tersebut aman digunakan, tidak berbahaya dan biasa digunakan dalam skala industri Akselerasi melalui akuisisi teknologi protein rekombinan pada sistem yeast akan membantu percepatan pengembangan vaksin Hepatitis B. Agar kandidat seed dapat diterima dan digunakan di industri kandidat tersebut harus terkarakterisasi dengan baik, stabilitasnya teruji dan data pembuatan seed didokumentasi dengan baik. (Nurainy *et al.*, 2012)

HBsAg telah diketahui sebagai transaktivator sel yang kuat dan gen virus. Berbagai interaksi dengan protein sel telah diusulkan sebagai target HBxAg (Ducancelle *et al.*, 2013).

## 2.2 Vaksin dan Imunisasi

Vaksin adalah sediaan yang mengandung zat antigenik yang mampu menimbulkan kekebalan aktif dan khas pada manusia. Vaksin dapat dibuat dari bakteri, ricketsia atau virus dan dapat berupa suspensi organisme hidup atau inaktif atau fraksi-fraksinya. Vaksin dibuat atau toksoid (Depkes RI, 1995). Menurut Kistner (2003), jenis vaksin dibedakan menjadi 3 yaitu vaksin virus hidup yang dilemahkan, vaksin virus inaktif/mati dan vaksin subunit.

Vaksin Hepatitis B adalah vaksin virus rekombinan yang telah diinaktivasikan dan bersifat *non-infecious*, berasal dari HbsAg yang dihasilkan dalam sel ragi (*Hansenula polymorpha*) menggunakan DNA rekombinan. Vaksin Hepatitis B digunakan untuk memberikan kekebalan aktif terhadap infeksi yang disebabkan oleh virus Hepatitis B, tapi tidak dapat mencegah infeksi virus lain seperti virus Hepatitis A atau C yang diketahui dapat menginfeksi hati (Kadir, Fatimah, & Hadia, 2014)

Imunisasi merupakan suatu program yang dengan sengaja memasukkan antigen lemah agar merangsang pembentukan antibodi sehingga tubuh dapat resisten terhadap penyakit tertentu. Sistem imun tubuh mempunyai suatu sistem memori (daya ingat). Ketika vaksin masuk ke dalam tubuh, maka akan dibentuk antibodi untuk melawan vaksin tersebut dan sistem memori akan menyimpannya sebagai suatu kejadian terpapar antigen. Jika nantinya tubuh terpapar dua atau tiga kali oleh antigen yang sama dengan vaksin maka antibodi akan tercipta lebih kuat dari vaksin yang pernah dihadapi sebelumnya (Kadir *et al.*, 2014)

WHO merekomendasikan agar vaksin hepatitis B dimasukkan dalam layanan imunisasi rutin di semua negara. Tujuan utama imunisasi hepatitis B adalah mencegah infeksi HBV kronis yang berakibat penyakit hati kronis dikemudian hari. Dengan mencegah infeksi HBV kronis, diharapkan dapat memutus rantai utama penularan infeksi baru (Nicoletta dan Daniel, 2002).

### 2.3 Bulk HbsAg (Hepatitis B surface Antigen)

HBsAg adalah komponen yang memiliki perlindungan terhadap HBV pada imunisasi. Untuk menghasilkan vaksin ini, kode gen untuk HBsAg, atau "S" gen, dimasukkan ke dalam vektor ekspresi yang mampu mengarahkan sintesis sejumlah besar HBsAg di *hansenula polimorfa*. Partikel HBsAg diekspresikan dan dimurnikan dari ragi sel-sel yang telah terbukti setara dengan HBsAg berasal dari plasma darah hepatitis B kronis (Gomez & Robinson, n.d.)

HbsAg terdiri dari kompleks antigen terkait dengan amplop virus dan berbentuk subviral (22 nm berbentuk bola dan partikel tubular). HBs Ag asli dikodekan oleh urutan gen amplop (S plus pre-S) dalam DNA virus. Vaksin hepatitis B yang berasal dari DNA rekombinan mungkin mengandung produk gen S atau produk kombinasi S / pre-S. (World Health Organization, 2008).

*Bulk* HBsAg harus ditentukan oleh metode *immunochemical* yang tepat. Bahan referensi yang sesuai harus dimasukkan dalam pembuatannya, sehingga konsistensi produksi dapat terpantau. bahan yang telah sesuai tersebut dapat menjadi acuan untuk produksi masal dengan persiapan yang sangat murni dari HBsAg yang diketahui, tentunya HBsAg dan kandungan protein dengan profil stabilitas yang diterima.

Penggunaan substrat sel apapun harus didasarkan pada sistem bank sel. NRA harus bertanggung jawab untuk menyetujui bank sel. Hanya sel yang telah disetujui dan terdaftar di NRA yang dapat digunakan untuk memproduksi HbsAg protein. Karakteristik regangan produksi rekombinan (yaitu sel inang dikombinasi dengan sistem vektor ekspresi) harus sepenuhnya dijelaskan, dan informasi harus diberikan tentang tidak adanya agen adventif dan homogenitas gen untuk MCB dan WCB. Penjelasan lengkap tentang biologis karakteristik sel inang dan vektor ekspresi harus diberikan. Kemudian langkah fisiologis yang digunakan untuk mengontrol ekspresi kloning gen dalam sel inang harus dijelaskan secara rinci. Ini harus mencakup genetik substrat sel dan bank sel yang disetujui oleh NRA. Rasio kandungan HBsAg dengan kandungan protein harus ditentukan. Salah satunya harus ditentukannya pengujian lipid. Kandungan lipid dari *final bulk HbsAg* harus ditentukan secara tepat baik metode yang digunakan maupun konsentrasi lipid yang diizinkan harus disetujui oleh NRA.

Jumlah residu yang berasal dari sistem ekspresi antigen (mis. DNA atau protein sel inang) harus ditentukan dalam setiap bagian monovalen yang dimurnikan antigen,

dengan metode yang sensitif. Dalam kasus produk turunan ragi, tes ini dapat dihilangkan untuk rilis lot rutin, setelah menunjukkan bahwa pemurnian proses secara konsisten menghilangkan komponen residu dari monovalen bulks.

Sel-sel *hansenula polimorfa* rekombinan yang mengekspresikan HBsAg adalah ditanam di fermentor tangki berpengaduk. Media yang digunakan dalam proses ini adalah media fermentasi kompleks yang terdiri dari ekstrak ragi, pepton kedelai, dekstrosa, asam amino, dan garam mineral. Pengujian dalam proses dilakukan pada fermentasi- produk untuk menentukan persentase sel inang dengan konstruksi ekspresi. Diakhir fermentasi proses, HBsAg dipanen dengan melisiskan sel-sel ragi. Ini dipisahkan oleh interaksi hidrofobik dan eksklusi ukuran kromatografi. HBsAg yang dihasilkan dirakit menjadi Partikel lipoprotein berdiameter 22 nm. HBsAg dimurnikan hingga lebih dari 99% untuk protein oleh serangkaian fisik dan metode kimia. Protein murni diolah dalam fosfat. buffer phosphate dengan formaldehida, difilter steril, dan kemudian coprecipitated dengan tawas (kalium aluminium sulfat) untuk bentuk vaksin massal yang disesuaikan dengan aluminium amorf hidroksifosfat sulfat. Vaksin tidak mengandung terdeteksi DNA ragi tetapi mungkin mengandung ragi tidak lebih dari 1% protein. (Gomez & Robinson, n.d.)

#### **2.4 Pengujian Lipid dalam Bulk**

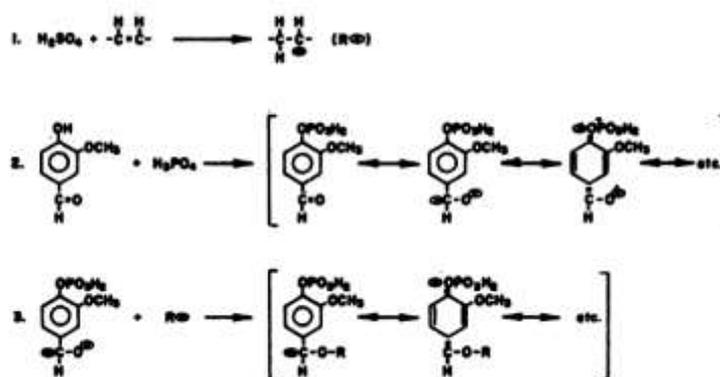
Lipid adalah sekelompok senyawa non heterogen yang meliputi asam lemak dan turunannya, lemak netral (trigliserida), fosfolipid serta sterol (Ganong ,2008). Lipid memiliki arti lain sebagai kelompok besar biomolekul dengan gugus fungsional karboksil (-COOH) atau gugus ester (-COOR), yang tidak dapat larut dalam air, tapi larut dalam larutan non polar, seperti eter, aseton, bensin, karbon tetraklorida, dan lain sebagainya (Baraas, 2006). Lipid akan larut dalam pelarut organik seperti aseton, alkohol, kloroform, eter, dan benzena (Kementerian Kesehatan RI, 2010).

Kinerja teknologi produksi dalam hal kemampuannya untuk membuat HBsAg sangat murni dan menghilangkan sebagian besar intrinsik (ragi total protein, asam nukleat, karbohidrat, lipid) serta kontaminan ekstrinsik (immunopurification-released immunoglobulin (Ig) G, endotoxin) perlu dianalisa. Hasil yang diperoleh diverifikasi, teknologi ini memenuhi sebagian besar persyaratan WHO untuk pemurnian yang aman dari partikel HBsAg yang berasal dari ragi, yang aktif secara biologis (Pento'n et al., 1994).

Pengujian lipid ini merupakan pengujian baru yang akan dilakukan oleh PT.Bio Farma. Alasan dilakukan pengujian lipid pada bulk HBsAg ini karena dimungkinkan adanya kontaminasi lain-lain seperti : lipid, karbohidrat dll yang melebihi batas maksimum kadar lipid dalam *bulk* HBsAg ini dan juga memungkinkan adanya residu dari ragi *Hansenula polymorpha* yang merupakan ragi yang digunakan dalam pengujian ini tetapi secara alami ragi ini tidak dapat menghasilkan protein HBsAG yang bisa adalah virus maka dilakukan rekayasa genetika (DNA)

Pengujian lipid dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri suatu teknik pengukuran cahaya yang diabsorpsi oleh zat berwarna baik warna yang terbentuk dari asalnya maupun akibat reaksi dengan zat lain (Vin & Khopkar, 1990). Menurut definisi yang diperluas, sebagai kolorimetri juga tercakup perubahan senyawa tidak berwarna menjadi zat yang berwarna dan penentuan fotometrinya dilakukan dalam daerah sinar tampak (400 – 800 nm) (Chen *et al.*, 1994).

Senyawa yang semula tidak berwarna harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa berwarna karena senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tampak. Cara yang digunakan adalah dengan mengubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, penetapan kadar lipid dapat menggunakan metode kolorimetri dengan menggunakan reagen *Sulfo-Phospo-Vanillin*. Reaksi yang terbentuk seperti berikut :



Gambar 2.2 urutan reaksi sulfo-phospo-vanillin

(Knight, Anderson, & Rawle, 1972)

Pada kondisi asam kuat (asam sulfat pekat), ikatan ganda karbon (lemak tak jenuh) membentuk ion karbonium. Vanilin dan asam fosfat bereaksi dengan ester fosfat meningkatkan reaktivitas gugus karbonil. Ion karbonium kemudian bereaksi dengan gugus karbonil teraktivasi pada phospho-vanillin membentuk senyawa berwarna.

Pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu :

- a. Reaksinya selektif dan sensitif
- b. Reaksinya cepat, kuantitatif, dan reproduisible
- c. Hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama

Kriteria untuk analisis kolorimetri yang baik adalah :

- a. Menghasilkan reaksi warna yang spesifik

Reaksi yang khas untuk suatu senyawa tertentu sangat sedikit jumlahnya, tetapi kebanyakan reaksi menghasilkan warna untuk sekelompok kecil zat, artinya reaksi-reaksi warna tersebut selektif. Dengan memasukkan senyawa pembentuk kompleks, mengubah keadaan kondisi dan pengendalian pH, dapat mencapai pendekatan kespesifisikan ini.

- b. Adanya proporsi yang sesuai antara warna dan konsentrasi

Untuk kolorimeter visual sangat penting bahwa intensitas warna harus meningkat secara linier dengan konsentrasi dari substansi yang ditentukan.

- c. Stabilitas warna

Warna yang dihasilkan harus cukup stabil untuk memungkinkan pembacaan serapan yang tepat dan cermat. Dalam hal ini periode warna maksimum harus cukup panjang.

- d. Reprodusibel

Prosedur kolorimetri harus memberikan hasil yang reprodusibel dalam kondisi yang spesifik.

- e) Kejernihan larutan

Larutan harus bebas dari pengotor atau endapan jika pembanding yang dipakai berupa standar yang jernih. Kekeruhan akan menyerap dan menghamburkan cahaya.

- f) Kepekaan yang tinggi

Hal ini harus diperhatikan terutama jika zat yang diukur kuantitasnya kecil ((Vol, 2002).

Larutan standar yang digunakan adalah soy bean oil. Minyak kedelai / Soy bean oil merupakan bahan yang terbuat dari kedelai dan banyak terdapat dalam makanan. Minyak kedelai dapat menyamarkan bau-bau yang khas seperti asam laktat, karbondioksida serta memiliki efek yang minimal bagi manusia jika digunakan sebagai repelen (Cox, 2005).

#### **2.4.1 Validasi Metode Analisis**

Validasi adalah tindakan pembuktian dan mendokumentasikan bahwa proses, prosedur atau metode yang benar dan secara konsisten mengarah pada hasil yang diharapkan (WHO, 2016). Validasi terhadap suatu metode analisa menjadi faktor penting karena hanya metode analisa yang telah dibuktikan validitasnya maka hasil pengukurannya bisa dipertanggungjawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya. Parameter yang dilakukan dalam melakukan validasi uji kadar zat impurities tersebut meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linieritas dan range, robustness, limit of detection dan limit of quantification (WHO, USP <1225>).

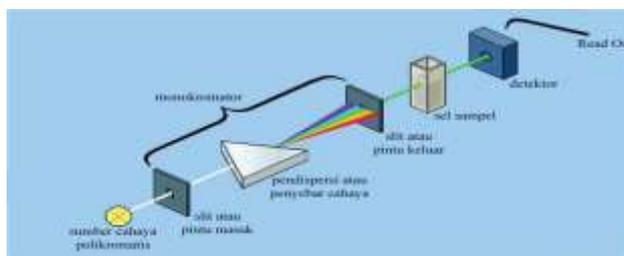
Uji *quality control* pada produk vaksin merupakan kegiatan rutin yang dilakukan dengan tujuan untuk menjaga agar produk vaksin yang diproduksi memenuhi spesifikasi dan persyaratan serta terjaga kualitasnya. Salah satu *quality control* vaksin Hepatitis B yaitu Uji Lipid, yang bertujuan untuk mengukur jumlah lipid dalam *bulk HbsAg*. Uji lipid menjadi sangat penting, karena dengan mengetahui kadar lipid yang terkandung dalam *bulk HbsAg*, vaksin yang memenuhi syarat kriteria penerimaan uji dapat dipastikan efektif dalam penggunaannya

Pengujian lipid ini merupakan pengujian baru yang akan dilakukan oleh PT.Bio Farma maka perlunya dilakukan Validasi agar pengujian tersebut tervaliditas dan memenuhi persyaratan sesuai rekomendasi WHO yang kemudian dapat dilakukan sebagai pengujian rutin.

#### **2.4.2 Spektrofotometri**

Spektrofotometri merupakan suatu metode analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor *fototube*. Spektrofotometri dapat dianggap sebagai perluasan suatu pemeriksaan visual dengan studi yang lebih mendalam dari absorpsi energi. Absorbansi radiasi oleh suatu sampel diukur pada berbagai panjang gelombang dan dialirkan oleh

suatu perekam untuk menghasilkan spectrum tertentu yang khas untuk komponen yang berbeda. (Suhartati, 2013)



Gambar 2.3 Spektrofotometri *UV-Vis* (Suhartati, 2013)

Jangkauan panjang gelombang yang tersedia untuk pengukuran membentang dari panjang gelombang pendek ultraviolet sampai ke garis inframerah. Untuk kemudahan pengacuan, daerah spektrum secara garis besar :

1. Daerah ultraviolet jauh : 100 nm – 190 nm
2. Daerah ultraviolet dekat : 190 nm – 380 nm
3. Daerah cahaya tampak : 380 nm – 780 nm
4. Daerah inframerah dekat : 780 nm – 3000 nm
5. Daerah inframerah :  $2,5 \mu\text{m} - 40 \mu\text{m}$  atau  $4000 \text{ cm}^{-1} - 250 \text{ cm}^{-1}$

Prinsip dari spektrofotometri *UV-Vis* adalah mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan. Ketika panjang gelombang cahaya ditransmisikan melalui larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (diabsorpsi). Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah absorbansi ( $A$ ), yang setara dengan nilai konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui (biasanya 1 cm dalam spektrofotometri) ke suatu point dimana persentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi diukur dengan phototube.

Spektrofotometri sederhana terdiri dari :

1. Sumber radiasi

Sumber radiasi monokromator kuvet detektor amplifier rekorder. Sumber cahaya berasal dari lampu Deutrium ( $H_0$ ) untuk UV dengan panjang gelombang 180 – 400 nm dan lampu Tungsten (*wolfram*) untuk Vis dengan panjang gelombang 400 – 800 nm.

2. Monokromator

Monokromator merupakan alat yang berfungsi sebagai penyeleksi cahaya dengan panjang gelombang tertentu. Monokromator akan memisahkan radiasi cahaya putih yang polikromatis menjadi cahaya monokromatis.

3. Kuvet

Pada umumnya spektrofotometri melibatkan larutan, dengan demikian diperlukan wadah/ sell untuk menempatkan larutan.

4. Detektor

Fungsinya mengubah energi radiasi yang jatuh mengenainya menjadi suatu besaran yang dapat diukur.

5. Amplifier

Fungsinya untuk memperkuat sinyal listrik.

6. Rekorder

Alat untuk mencatat, dapat berupa gambar/angka-angka.

### 2.4.3 Optimasi waktu suhu inkubasi

Optimasi waktu suhu inkubasi bertujuan untuk menentukan waktu optimum terbaik pada suhu yang telah ditentukan. kemampuan suatu metode analisa dalam mengukur analit untuk tidak terpengaruh oleh berbagai perubahan kondisi seperti suhu, kelembaban, perubahan pH, reagen dan lain-lain. Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi.

#### **2.4.4 Validasi metode analisis**

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis meliputi :

##### **1. Spesifisitas (Selektifitas)**

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (degree of bias) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemar, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. (Harmita, 2004 : WHO, 1997).

##### **2. Linearitas dan Rentang**

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Rentang merupakan batas atas dan batas bawah dari parameter linearitas.

Cara penentuan linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya.

Menentukan koefisien korelasi R untuk pengenceran sampel di atas kisaran diklaim untuk pengujian tersebut. Siapkan 6 hingga 8 pengenceran sampel di seluruh rentang yang diklaim. Uji setiap pengenceran dalam rangkap tiga selama minimal 3 kali. Catat nilai yang diharapkan, nilai aktual, dan % pemulihan untuk setiap pengukuran. Analisis setiap set pengenceran sebagai kurva linear dan hitung R untuk setiap pengujian. Hitung akurasi dan presisi pada setiap pengenceran, dimana range adalah konsentrasi tertinggi dan terendah dengan akurasi dan presisi yang memuaskan.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier  $Y = a + bX$ . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

### 3. Sensitifitas (Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Cara penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrumen atau tidak. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blangko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blangko dan formula di bawah ini dapat digunakan untuk perhitungan

$$Q = (k \times S_b) / S_1$$

$$Q = \text{BD (batas deteksi) atau BK (batas kuantitasi)}$$

$$k = 3 \text{ untuk batas deteksi atau } 10 \text{ untuk batas kuantitasi}$$

Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ( $S_y/x$ .)

$$\text{Karena } k = 3 \text{ atau } 10$$

$$\text{Simpangan baku (Sb)} = S_{y/x},$$

Maka,

- a. Batas deteksi (Q)

$$Q = \frac{3.3 S_{y/x}}{S_l}$$

- b. Batas kuantitasi (Q)

$$Q = \frac{10 S_{y/x}}{S_l}$$

#### 4. Presisi (Keseksamaan)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Cara penentuan keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari batch yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari batch yang sama. Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analis yang berbeda. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Ditemukan bahwa koefisien variasi meningkat seiring dengan

menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5% ada pada satu per seribu adalah 5%.

Hasil analisis adalah  $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n$

maka simpangan bakunya adalah

$$SD = (\sum (x_i - \bar{x})^2) / n - 1$$

Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) adalah:

$$KV = SD/\bar{x} \times 100\%$$

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini.

## 5. Kecermatan (*Accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur. (Agency, 2006)

Cara penentuan kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan).

Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. % Perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksepien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

Kadar analit dalam metode penambahan baku dapat dihitung sebagai berikut:

$$\frac{C}{C+S} = \frac{R_1}{R_2}$$

$$C = S \left[ \frac{R_1}{R_2 - R_1} \right]$$

C = kadar analit dalam sampel

S = kadar analit yang ditambahkan pada sampel

R<sub>1</sub> = respon yang diberikan sampel

R<sub>2</sub> = respon yang diberikan campuran sampel dengan tambahan analit

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = (CF - CA) / C^*A \times 100$$

CF = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

CA = konsentrasi sampel sebenarnya

C\*A = konsentrasi analit yang ditambahkan