

**VALIDASI METODE UJI KADAR PROTEIN PADA *BULK*  
HBsAg PRODUKSI PT. BIO FARMA DENGAN METODE  
LOWRY SERTA KARAKTERISASI ZETA POTENSIAL**

**SKRIPSI**

**ANDRIAN RAMADHAN  
A 162 004**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
YAYASAN HAZANAH  
BANDUNG  
2020**

**VALIDASI METODE UJI KADAR PROTEIN PADA *BULK*  
HBsAg PRODUKSI PT. BIO FARMA DENGAN METODE  
LOWRY SERTA KARAKTERISASI ZETA POTENSIAL**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**ANDRIAN RAMADHAN  
A 162 004**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
YAYASAN HAZANAH  
BANDUNG  
2020**

**VALIDASI METODE UJI KADAR PROTEIN PADA *BULK*  
HBsAg PRODUKSI PT. BIO FARMA DENGAN METODE  
LOWRY SERTA KARAKTERISASI ZETA POTENSIAL**

**ANDRIAN RAMADHAN  
A 162 004**

Agustus 2020

Disetujui oleh :

Pembimbing

Pembimbing

Dr. Erman Tritama, M.Si.

Syarif Hamdani, M.Si.

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

*Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah skripsi ini dipersembahkan untuk kedua orang tua, adik dan para sahabat yang selalu setia memberikan semangat serta mendoakan setiap saat.*

## ABSTRAK

*Bulk* HBsAg merupakan bahan utama dalam pembuatan vaksin Hepatitis B rekombinan yang berasal dari antigen permukaan virus Hepatitis B. Sebelum menuju tahap selanjutnya, *bulk* HBsAg yang telah diproduksi harus diukur kadar proteinnya serta dilakukan karakterisasi zeta potensial sebagai salah satu cara untuk mengetahui stabilitasnya. Kadar protein pada *bulk* HBsAg yang diproduksi oleh PT. Bio Farma diukur menggunakan metode Lowry. Untuk itu, dilakukan validasi pada pengukuran kadar protein dengan metode Lowry dengan menggunakan Bovine Serum Albumin sebagai standar. Pengukuran kadar protein dengan metode uji Lowry pada waktu inkubasi selama 30 menit setelah penambahan pereaksi Folin Ciocalteu's Phenol telah tervalidasi dapat mengukur protein secara spesifik dengan %recovery dalam batas rentang 90 – 110% pada setiap parameter dengan batas deteksi pada 4 µg/ mL dan dapat terkuantisasi dengan baik pada sampel dengan konsentrasi 8 µg/ mL. Pada analisis ANOVA diperoleh  $H_0 > \alpha$  (0,05) yang berarti pengujian dengan metode Lowry telah memenuhi kriteria penerimaan validasi. Zeta potensial diuji menggunakan Malvern Zetasizer dan diperoleh nilai zeta potensial *bulk* HBsAg yang baik sebesar -13.1 mV.

**Kata kunci :** HBsAg, Lowry, validasi, protein, Zeta potensial.

## **ABSTRACT**

*Bulk HBsAg is the main ingredient in the manufacture of Hepatitis B recombinant vaccine, derived from the surface antigen of the Hepatitis B virus. Before proceeding to the next stage, the protein content of the bulk HBsAg that has been produced must be measured and also the zeta potential characterization was carried out as a way to determine its stability. Protein content in the bulk HBsAg produced by PT. Bio Farma was measured using the Lowry method. For this reason, validation was carried out on the protein content using the Lowry method with Bovine Serum Albumin as the standard. Measurement of the protein content using Lowry method with 30 minutes incubation time after the addition of Folin Ciocalteu's Phenol reagent has been validated to measure protein specifically with % recovery in the range between 90-110% for each parameter with a detection limit of 4 µg / mL and can be quantized well in a concentration of 8 µg / mL. In the ANOVA analysis, it is obtained that  $H_0 > \alpha$  (0.05), which means that the Lowry method has met the validation acceptance criteria. Zeta potential was tested using the Malvern Zetasizer and obtained a good zeta potential value of HBsAg of -13.1 mV.*

**Keywords :** *HBsAg, Lowry, validation, protein, Zeta Potential.*

## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji dan syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat serta karunia yang telah dilimpahkan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Validasi Metode Uji Kadar Protein Pada Bulk HBsAg Dengan Metode Lowry Serta Karakterisasi Zeta Potensial Bulk HBsAg**” di bawah bimbingan Dr. Erman Tritama, M.Si dan Syarif Hamdani, M.Si.

Tidak lupa ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga diberikan kepada :

1. apt. Adang Firmansyah, M.Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. apt. Revika Rachmaniar, M.Farm., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
3. Seluruh Staf Pengajar dan Karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia
4. Yusuf Sofyan E selaku *Research Coordinator* PT. Bio Farma,
5. Gilang Nadia selaku *Researcher* PT. Bio Farma,
6. Risma Wiharyanti selaku *Junior Researcher* PT. Bio Farma,
7. Gilang Adi Nugraha selaku *Operational Staff* PT. Bio Farma,
8. Rekan-rekan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia angkatan 2016 terutama kelas Reguler Sore yang selalu menambah semangat untuk belajar dan meringankan lelah setelah bekerja.

Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu diharapkan adanya saran dan kritik yang membangun. Akhir kata dengan penuh harapan semoga skripsi ini mendapat berkah dan ridho dari Allah SWT dan dapat bermanfaat.

*Aamiin Ya Rabbal'alamin*

Bandung, Agustus 2020

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Identifikasi Masalah .....	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	2
1.4. Kegunaan Penelitian.....	3
1.5. Waktu dan Tempat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Virus Hepatitis B .....	4
2.2. Vaksin.....	5
2.3. Protein.....	6
2.3.1. Protein HBsAg .....	7
2.4. Analisis Protein .....	7
2.4.1. Analisis Kualitatif .....	7
2.4.2. Analisis Kuantitatif .....	8
2.5. Zeta Potensial .....	9
2.6. Spektrofotometri Sinar Tampak .....	10

2.6.1.	Hukum Lambert-Beer .....	11
2.6.2.	Instrumentasi Spektrofotometri.....	12
2.7.	Validasi.....	14
2.7.1.	Akurasi .....	14
2.7.2.	Presisi .....	14
2.7.3.	Spesifitas .....	14
2.7.4.	Linieritas .....	14
2.7.5.	Batas deteksi (LOD).....	14
2.7.6.	Batas kuantitasi (LOQ) .....	15
2.7.7.	Robustness.....	15
<b>BAB III</b>	<b>TATA KERJA .....</b>	<b>16</b>
3.1.	Alat .....	16
3.2.	Bahan.....	16
3.3.	Metode Penelitian.....	16
3.3.1.	Pembuatan Larutan Standar .....	16
3.3.2.	Pengujian.....	17
3.3.3.	Zeta potensial .....	20
3.4.	Kriteria Penerimaan.....	21
	(Hunter, 1981) .....	22
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>23</b>
4.1.	Pembuatan Kurva Standar .....	23
4.2.	Validasi Metode Uji .....	23
4.3.	Zeta Potensial .....	28
<b>BAB V</b>	<b>SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA.....</b>	<b>31</b>
5.1.	Simpulan.....	31
5.2.	Alur Penelitian Selanjutnya.....	31

<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>35</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3. 1. Konsentrasi Pengenceran Larutan Standar Rentang 20 – 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	16
3. 2. Contoh Uji Linearitas dan Rentang 20 – 100 $\mu\text{g/mL}$ .....	19
3. 3. Kriteria Penerimaan Hasil Uji.....	21
3. 4. Kestabilan Koloid Terhadap Nilai Potensial Zeta.....	22
4. 1. Perbandingan Kadar BSA Teoritis dengan Kadar Terukur.....	24
4. 2. Hasil Pengujian Akurasi.....	25
4. 3. Uji Presisi Variasi Hari .....	25
4. 4. Uji Presisi Variasi Personil .....	26
4. 5. Hasil Uji Linieritas .....	26
4. 6. Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi Teoritis.....	27
4. 7. Data Hasil Pengujian Robustness.....	28

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 Virus Hepatitis B.....	4
2. 2. Skema Alat Spektrofotometer .....	12
4. 1. Kurva Standar BSA.....	23
4. 2 Hasil Pengujian Zeta Potensial.....	29
4. 3. Hasil Pengujian Distribusi Ukuran Partikel Protein <i>Bulk</i> HBsAg .....	30

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Pengujian Spesifisitas .....	35
2. Perhitungan Uji Spesifisitas .....	36
3. Anova Spesifisitas .....	37
4. Hasil Pengujian Linieritas .....	38
5. Hasil Perhitungan Linieritas .....	44
6. Hasil Pengujian Akurasi .....	45
7. Hasil Pengujian Presisi P1H1 .....	46
8. Hasil Pengujian Presisi P1H2 .....	47
9. Hasil Pengujian Presisi P1H3 .....	48
10. Anova Presisi Variasi Hari .....	49
11. Hasil Pengujian Presisi P1 .....	50
12. Hasil Pengujian Presisi P2 .....	51
13. Hasil Pengujian Presisi P3 .....	52
14. ANOVA Presisi Variasi Personil .....	53
15. Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi .....	54
16. Hasil Perhitungan Batas Deteksi Dan Batas Kuantisasi Teoritis .....	55
17. Hasil Pengujian Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi .....	56
18. Hasil Pengukuran Batas Deteksi Dan Batas Kuantisasi Aktual .....	57
19. Hasil Pengujian Robustness 15 Menit .....	59
20. Hasil Pengujian Robustness 30 Menit .....	60
21. Hasil Pengujian Robustness 60 Menit .....	61
22. ANOVA Robustness .....	62
23. Hasil Pengujian Zeta Potensial HBsAg JANSSEN .....	63
24. Hasil Pengujian Zeta Potensial HBsAg PT. BIO FARMA .....	64

## DAFTAR PUSTAKA

- Barba, A. A. dkk. 2019. *Nanomaterials for Drug Delivery dan Therapy*. William Andrew Applied Science Publisher. Hal. 285.
- Bio Farma. 2019. *Guideline Validation Master Plan*. Bandung: PT Bio Farma.
- Bio Farma. 2019. "*Laporan Validasi Pengukuran Konsentrasi Hydrazide*". Bandung: Bio Farma.
- Bio Farma. 2019. "*Validasi Pengujian Protein dengan Metoda Lowry*". Bandung: Bio Farma.
- Clogston, J. D. 2009. *Measuring Zeta Potential of Nanoparticles*. Maryland: Nanotechnology Characterization Laboratory.
- Ellya, E. 2010. *Gizi Dalam Kesehatan Reproduksi*. Jakarta: Trans Info Media.
- Hardy, E. 2000. "Large-scale Production of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen from *Pichia pastoris*". *Journal of Biotechnology*. Hal. 157-167.
- Hunter, R. J. 1981. *Colloid Science*. New South Wales: Academic Press.
- Inaku, H. 2009. "Gambaran Penolong Persalinan, Logistik Vaksin dan Dukungan Keluarga Pada Cakupan Imunisasi Hepatitis" B 0-7. *Jurnal Pelangi Ilmu*, 2(5), Hal. 46-65.
- Jaeyeon, P. d. 2016. Easy and Rapid Quantification of Lipid Contents of Marine Dinoflagellates Using The sulpho-phospho-vanillin Method. *Algae*, 31 (4), Hal. 391-401.
- Kemenkes. 2015. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Liljeqvist, S., & Stahl, S. 1999. "Production of Recombinant Subunit Vaccines: Protein Immunogenes, Live Delivery Systems and Nucleic Acid Vaccines". *J. Biotech*, 1-33.
- Malvern Tech. 2020. *Zeta Potential Analysis of Nanoparticles*. San Diego: Malvern Tech. NanoComposix.

- Martoharsono, S. 1998. *Biokimia Jilid 1*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Mulja, M., & Suharman. 1995. *Analisis Instrumental Edisi 1*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Nurainy, dkk. 2012. "Pengembangan Vaksin Hepatitis B Berbasis Protein Rekombinan Subunit Indonesia". *Prosiding InSINas*.
- Price, S., & Wilson, L. M. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-proses Penyakit, Edisi 6, Vol. 2*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Salgin, D. 2012. "Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strength". *International Journal of Electrochemical Science*, Hal. 12404-12414.
- Soeharsono. 2006. *Biokimia 1*. Yogyakarta: UGM Press.
- Strachan, T., & Read, A. 1999. *Human Molecular Genetics 2. Second Edition*. New York: A John Wiley & Sons. Inc.
- Underwood, A. L., & Day, R. A. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Unnikrishnan, D. 2012. "Recombinant Bacterial Vaccines". *Current Opinion in Immunology*. Hal. 337-342.
- United States Pharmacopeia and National Formulary. 2016. *Protein Determination Procedure*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2016. Hal: 507
- Walsh, G. 2003. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology Second Edition*. England: Wiley.
- WHO. 2002. *Hepatitis B*. Departement of Communicable Diseases Surveillance and Response.



WHO. 2007. *Quality Assurance of Pharmaceuticals Vol. 2, 2nd Update Edition*. Geneva: World Health Organization.

WHO. 2013. TRS No. 987. Dalam WHO, *Annex 4 WHO Technical Report Series, No. 987*. World Health Organization.

WHO. 2016, May. Guidelines on Validation. *Working Document QAS/16.666*. Hal. 5.

Wong, D. 2007. *The ABC of Gene Cloning*. New York: International Thomson Publishing.