

VALIDASI PARSIAL UJI PENETAPAN KADAR VIRULENSI (Vi) PADA PRODUK RUAHAN POLISAKARIDA VIRULENSI (Vi), PRODUK RUAHAN KONJUGAT VIRULENSI- DIFTERIA (ViDT), DAN PRODUK AKHIR VAKSIN TIFOID KONJUGAT DENGAN METODE HPAEC- PAD

Ginayanti Hadisoebroto⁽¹⁾, Siti Azizah K.⁽²⁾, Atin Supriyatin⁽¹⁾

⁽¹⁾ Prodi Farmasi, Universitas Al-Ghifari

⁽²⁾ PT. Biofarma Bandung

ABSTRAK

Vaksin konjugat dibuat dengan menggunakan bagian kapsul bakteri. Kapsul tersebut mengandung antigen polisakarida Vi, di mana Vi merupakan faktor untuk menentukan tingkat patogen di dalam bakteri dan antigen merupakan molekul struktur turunan dari bakteri yang dapat memicu respon imun protektif ketika dikombinasikan dengan molekul struktur yang lebih besar seperti carrier protein. Antigen polisakarida Vi berhubungan dengan imunogenisitas yang merupakan kemampuan suatu imunogen untuk menginduksi respon imun di dalam tubuh. Maka dari itu kadar Vi diuji untuk melihat dan menilai seberapa efektif dan protektif vaksin typhoid Vi jenis konjugasi ini. Metode HPAEC-PAD adalah kromatografi pertukaran anion berkinerja tinggi untuk kuantifikasi kandungan sakarida bebas dan total dari vaksin konjugasi tifoid (konsentrat bulk atau fill akhir) sakarida yang dipisahkan dideteksi dengan Pulsed Amperometric Dection (PAD). Metode tersebut perlu dilakukan validasi untuk menghasilkan data yang diyakini konsisten sesuai dengan spesifikasi yang telah ditetapkan. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa metode HPAEC-PAD yang digunakan akan memberikan ketelitian, ketepatan serta ketegaran (Robustness) yang memenuhi persyaratan.

Kata Kunci: Vaksin konjugat, Virulensi (Vi), HPAEC-PAD

ABSTRACT

Conjugate vaccine is made by using the bacterial capsule section. The capsule contains Vi polysaccharide antigens, in which Vi is a virulence factor for determining pathogen levels in bacteria and the antigen is a derived structure molecule of bacteria that can trigger protective immune responses when combined with larger structural molecules such as carrier proteins. Vi polysaccharide antigens are associated with immunogenicity which is the ability of an immunogen to induce an immune response in the body. Therefore Vi is tested to see and assess how effective and protective the typhoid vaccine Vi this type of conjugation. The HPAEC-PAD method is a high-performance anion exchange chromatography for the quantification of free and total saccharide content of the separated saccharide conjugate vaccine (separated bulk concentrate or fill) separately detected by Pulsed Amperometric Dection (PAD). The method needs to be validated to produce data that is believed to be consistent with the specified specifications. The purpose of this study is to prove that the HPAEC-PAD method used will provide accuracy, precision and Robustness that meet the requirements.

Keywords: Conjugate Vaccine, Virulence (Vi), HPAEC-PAD

PENDAHULUAN

Tifoid merupakan sebuah penyakit akut dan sering mengancam jiwa, ditularkan melalui rute fecal-oral (rute perpindahan mikroba yang berasal dari kotoran manusia ke rongga mulut manusia) oleh bakteri *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S.typhi*). Setiap individu bisa terinfeksi dengan mengkonsumsi air yang terkontaminasi atau makanan, dan juga setelah kontak dengan pasien atau ex-pasien. Pasien bisa menjadi agen pembawa penyakit tersebut seumur hidup dan pasien tersebut mensekresikan *S.typhi* dari dalam tubuhnya melalui kotorannya, menjadi sebuah faktor yang sangat berpengaruh dalam perbaikan siklus *S.typhi* di dalam populasi. *S.typhi* tersebut tidak menginfeksi hewan akan tetapi hanya bertransmisi dari manusia ke manusia lainnya (Alba et al., 2016).

Pengamatan terbaru terhadap penyakit tifoid menunjukkan bahwa ditemukan 13,5 juta kasus tifoid secara global pada tahun 2010 (Buckle et al., 2010). Tingkat insiden tertinggi dari penyakit tifoid telah terekam di Afrika dan Asia (Crump et al., 2004). Sebuah penelitian di Indonesia yang dilakukan di daerah kumuh Jakarta, diperkirakan tingkat insiden tifoid terjadi pada 148,7 per 100.000 orang dalam satu tahun pada kelompok usia 2-4 tahun, 180,3 pada kelompok usia 5-15 tahun dan 51,2 pada kelompok usia lebih dari 16 tahun (Ochiai et al., 2008). Tanpa pengobatan yang efektif, tifoid memiliki tingkat keparahan kasus 10-30%, tetapi jumlah ini berkurang menjadi 1-4% pada mereka yang menerima terapi yang tepat (Buckle et al., 2010).

Organisasi Kesehatan Dunia / World Health Organization (WHO) telah menetapkan bahwa kontrol terhadap penyakit tifoid harus berpusat pada pengobatan dan perbaikan sanitasi serta pemeliharaan air. Jika tidak terdapat air bersih dan perbaikan sanitasi lingkungan pada wilayah dengan tingkat endemik tifoid terberat, maka vaksinasi adalah cara yang paling efektif dan ekonomis untuk mengontrol dan meminimalisir jumlah kasus penyakit ini (McGregor et al., 2013).

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan kini ada sebuah vaksin dengan biaya rendah yang manjur melawan demam tifoid, terutama untuk bayi, vaksin ini akan memberikan dampak besar pada beban penyakit di negara-negara berkembang. Polisakarida kapsul Virulensi *Salmonella Typhi* (Vi) yang digabungkan dengan rekombinan mutan *Pseudomonas aeruginosa* exoprotein A (Vi-rEPA) telah terbukti sangat manjur. (Micoli, et al., 2011)

Vaksin konjugat Vi telah ditemukan dan dikembangkan oleh beberapa laboratorium dan manufaktur. Pada vaksin konjugat Vi tersebut menggunakan carrier protein seperti toksoid difteria atau tetanus (DT atau TT), rekombinan eksoprotein A (rEPA), rekombinan toksin difteria (CRM197),

konjugat Vi yang telah disintesis menjadi lebih imunogenik secara signifikan dibandingkan dengan Vi saja. Saat ini, dua konjugat Vi-toksoid tetanus (Vi-TT) telah dilisensi oleh India untuk digunakan oleh semua umur, mulai dari umur 3 bulan. Generasi baru dari vaksin tifoid konjugat ini telah membuka era baru untuk pencegahan dan pengurangan penyakit tifoid (Szu et al., 2013).

Kapsul pada bakteri secara kimia terhubung ke carrier protein, dan kombinasi tersebut digunakan sebagai vaksin. Carrier protein yang digunakan yaitu diphtheria toxoid (DT), DT dipilih karena mudah didapat dan tersedia di beberapa negara yang mengembangkan vaksin, memiliki harga yang terjangkau sehingga dapat memiliki biaya produksi yang masih terjangkau pula, dan stabil pada pH yang digunakan pada proses konjugasi (Erman, 2015).

Antigen polisakarida Vi digunakan untuk memicu respon imun dalam tubuh, dan jumlah antigen polisakarida Vi ini sangat penting diketahui jumlahnya untuk menentukan tingkat respon imun yang dihasilkan oleh vaksin tifoid konjugat di dalam tubuh manusia. Maka dari itu jumlah atau kadar ini harus diketahui dengan menggunakan analisis kuantitatif dengan metode HPAEC-PAD. Kadar Vi yang ditetapkan dalam satu vial vaksin yaitu sebanyak 2,5 µg untuk dapat memberikan perlindungan yang optimal. (Micoli, et al., 2011)

Teknik kromatografi yang dikenal sebagai pertukaran anion berkinerja tinggi (HPAE) ini dikembangkan untuk memisahkan karbohidrat. Digabungkan dengan pulsed amperometric detection (PAD), ini memungkinkan kuantifikasi langsung dari karbohidrat. Kromatografi HPAAE mengambil keuntungan dari sifat asam lemah karbohidrat untuk memberikan pemisahan yang sangat selektif pada pH tinggi menggunakan fase stasioner penukar anion yang kuat. (Rohrer, 2004).

Meskipun kromatografi pertukaran anion telah digunakan secara luas untuk menganalisis karbohidrat dan glikopeptida asam, belum umum digunakan untuk analisis gula netral. Pada pH tinggi, mereka setidaknya terionisasi sebagian, dan dengan demikian dapat dipisahkan oleh mekanisme pertukaran anion. Pendekatan ini tidak dapat digunakan dengan kolom-kolom berbasis silika klasik karena matriks-matriks ini larut pada pH tinggi. (Rohrer, 2004).

Validasi terhadap suatu metode analisa menjadi faktor penting karena hanya metode analisa yang telah dibuktikan validitasnya maka hasil pengukurannya bisa dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya. Beberapa parameter dalam melakukan validasi tersebut meliputi ketelitian, ketepatan serta robustness.

Validasi Parsial Uji.. (Ginayanti H., dkk)

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Larutan standar Vi 500 µg/ ml, NaOH 10 N, DIW, buffer MES 100 mM, larutan standar Vi 50 µg/ ml, bulk Vi DT, bulk Polisakarida Vi, obat jadi vaksin ViDT, PDT, PBS, 2-PE.

Alat

Instrumen HPAEC-PAD, kolom Carbpac PA-1, aminotrap, oven/ furnace, sentrifuga, filter nylon membrane 0,22 µm, syringe 1 ml, cryotube, eppendorf tube, pallet, botol injek, micropipette, fintip.

Kondisi instrument HPAEC- PAD

Pada penelitian ini kolom yang digunakan yaitu Carbpac PA-1, Aminotrap dengan detector pH-Ag/ AgCl (reference), Gold (Working). Sedangkan fase gerak yang digunakan yaitu 400mM NaOH, 500mM NaNO₃, H₂O. Volume injeksi sebesar 75µL dengan laju alir 1 ml/min. Waktu elusi berkisar 31 menit dengan retensi 6,8-7,5 menit.

Penetapan kadar Vi total

1. Membuat pengenceran standar Vi

Tabel 1
Persiapan Standar Vi

No.	Konsentrasi Vi (µg/ ml)	Volume standar Vi	Volume buffer MES
A	100	200	800
B	75	150	850
C	50	500 dari A	500
D	25	500 dari C	500
E	12.5	500 dari D	500
F	0	0	1000

2. Hidrolisa larutan standar dan sampel uji selama 4 jam dengan melarutkan standard an sampel uji masing- masing sebanyak 480µl dengan NaOH 10 N sebanyak 120µl.
3. Konfirmasi volume akhir setelah hidrolisa.
4. Filter standar dan sampel uji dengan filter nylon 0,22µm.
5. Siap masuk HPAEC PAD

Parameter Validasi

a. Ketepatan (accuracy)

Pengujian ini menggunakan sampel uji standar Vi 50 µg/ml dan Bulk ViDT dispiki dengan standar Vi 1:1 dengan pengulangan sebanyak 10 kali. Kemudian dilakukan penetapan kadar Vi total.

$$\frac{\text{Kadar Vi total yang terukur}}{\text{Kadar Vi total yang sebenarnya}} \times 100\% \quad (a)$$

Kriteria penerimaan diberikan jika hasil analisis memberikan perolehan kembali antara 90-110%. (Erman : 2018)

b. Presisi

Dalam pengujian ini dilakukan secara *Intra Assay Precision* dan *Inter Assay Precision* dengan sampel uji standar Vi 50 µg/ml, bulk polisakarida Vi dan bulk konjugat ViDT. Semua sampel uji dibuat sebanyak 10 kali pengulangan.

1. Intra Assay Precision

Melakukan penetapan kadar Vi total pada standard an sampel uji.

$$\frac{\text{Standar Deviasi}}{\text{Rata-rata kadar yang terukur}} \times 100\% \quad (1)$$

Kriteria penerimaan jika $CV \leq 5\%$.

2. Inter Assay Precision

a. Variasi hari pengujian

Uji penetapan kadar Vi total ini dilakukan 10 kali pengulangan pada 3 hari yang berbeda namun dengan pelaksana yang sama.

b. Variasi pelaksana pengujian

Pada uji ini penetapan kadar Vi total dilakukan sebanyak 10 kali pengulangan dengan 3 orang pelaksana berbeda pada hari yang sama.

c. Menghitung rata-rata, standar deviasi dan koefisien variasi.

d. Menganalisa hasil uji dengan analisa statistik ANOVA untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan antara pelaksana pengujian yang berbeda da nada atau tidaknya perbedaan pengujian pada hari yang berbeda.

c. Kekuatan (Robustness)

Pada pengujian ini digunakan sampel uji larutan standar Vi 50µg/ ml dan bulk ViDT. Dilakukan dengan 2 variasi yaitu :

1. Variasi hidrolisis

Penetapan kadar Vi dari standar Vi 50µg/ ml sebanyak 10 kali pengulangan dengan dihidrolisis dan tanpa dihidrolisis terlebih dahulu. Kemudian menganalisa statistik ANOVA terhadap luas area puncak standar Vi antara dihidrolisis dan tidak dihidrolisis terlebih dahulu.

2. Variasi waktu inkubasi pada suhu 110°C

Penetapan kadar Vi pada bulk ViDT sebanyak 10 kali pengulangan dengan variasi waktu hidrolisis selama 2 jam, selama 4 jam dan selama 6 jam.

Analisa statistika ANOVA dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan hasil uji antara variasi waktu inkubasi pada suhu 110°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

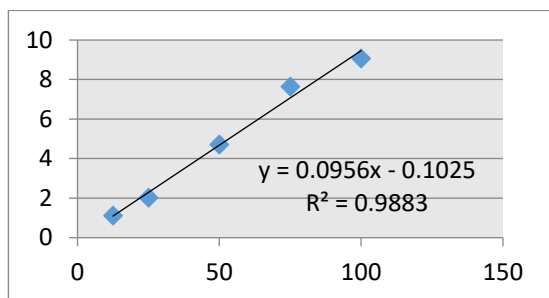
1. Pembuatan larutan standar Vi

Larutan standar dibuat dengan rentang konsentrasi yang terdiri dari 6 seri standar, dengan konsentrasi Vi 0;12,5;25;50;75;100 µg/mL. Rentang standar ini dibuat berdasarkan perbandingan antara kadar dengan luas area analit. Pada hasil uji dengan metode HPAEC-PAD menunjukkan data sebagai berikut :

Tabel 2
Tabel Data Larutan Standar

Konsentrasi	Luas Area
12,5	1,1257
25	2,0305
50	4,7224
75	7,6466
100	9,0698

Kurva yang terbentuk sebagai berikut:



Gambar 1
Grafik Larutan Standar

Persamaan regresi linier pada kurva diatas digunakan untuk menghitung konsentrasi awal contoh uji validasi, dan digunakan pada beberapa parameter uji validasi seperti uji presisi dan *robustness*.

Konsentrasi contoh uji produk ruahan polisakarida Vi dan produk ruahan konjugat ViDT memiliki konsentrasi yang lebih besar dibandingkan dengan rentang konsentrasi yang dibuat pada seri larutan standar. Maka dari itu, pengenceran dilakukan untuk kedua contoh uji tersebut, untuk contoh uji produk ruahan polisakarida Vi dilakukan 20x pengenceran sedangkan untuk contoh uji produk ruahan konjugat ViDT dilakukan 3x pengenceran. Sedangkan untuk produk vaksin tifoid konjugat tidak dilakukan pengenceran karena konsentrasinya berada pada rentang konsentrasi larutan standar.

2. Ketepatan (Accuracy)

Parameter validasi akurasi bertujuan untuk mengukur kedekatan nilai antara nilai sebenarnya

dengan nilai hasil pengukuran, yang dinyatakan dengan bias atau %*Recovery* (WHO, 1997). Uji parameter akurasi menggunakan contoh uji yang sudah diketahui konsentrasinya yaitu contoh uji Vi 50µg/mL dan ViDT yang dispiked dengan Vi.

Tabel 3
Tabel Hasil Uji Akurasi

Nama contoh uji	%Recovery
Vi 50µg/ml	101,4 %
ViDT dispiked Vi	98,7 %

Hasil perhitungan %*Recovery* dari data hasil pengukuran yaitu sebesar 101,4% dan 98,7% hasil tersebut sesuai dengan kriteria penerimaan parameter akurasi dengan rentang penerimaan antara 90%-110% dan menunjukkan bahwa metode penetapan kadar Vi akurat pada kedua contoh uji.

3. Presisi

a. Uji Intra Presisi (Intra Assay Precision)

Parameter uji intra presisi bertujuan untuk mengukur kedekatan antara nilai-nilai hasil pengukuran yang dinyatakan sebagai koefisien variasi (%CV), yang didapatkan dari pembagian antara standar deviasi dengan rata-rata hasil pengujian (WHO, 1997). Hasil uji intra presisi untuk ketiga contoh uji dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 4
Tabel Hasil Uji Intra Presisi

Nama Contoh Uji	%CV
Produk ruahan polisakarida Vi	1,62
Produk ruahan konjugat ViDT	5,36
Produk akhir vaksin tifoid konjugat	7,61

Hasil uji intra presisi menunjukkan kesesuaian dengan kriteria penerimaan dengan %CV < 10%, hal ini menunjukkan bahwa hasil pengukuran kadar dengan metode HPAEC PAD terkategori presisi.

b. Uji Inter Presisi (Inter Assay Precision)

Uji presisi pada parameter uji inter presisi dilakukan pada tiga hari yang berbeda secara kontinyu, uji ini berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh atau perbedaan kedekatan nilai-nilai hasil pengukuran pada hari yang berbeda. Metode analisis yang digunakan untuk mengetahui pengaruh perbedaan hari pengujian tersebut adalah

metode analisis variansi (ANOVA) satu arah, karena variabel bebas yang digunakan hanya variasi perbedaan hari pengujian. Adapun hasil uji inter presisi variasi hari pengujian dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5
Tabel Hasil Uji Inter Presisi

Nama contoh uji	Variasi hari pengujian		
	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3
Bulk Polisakarida Vi	1,62	2,07	2,23
Bulk konjugat ViDT	4,52	2,77	3,66
Vaksin tifoid konjugat	7,61	1,84	1,43

Dari hasil diatas terlihat ketiga contoh uji tersebut memiliki nilai CV < 10%. Setelah uji ANOVA didapat nilai P-value sebagai berikut :

Tabel 6
Tabel Hasil Uji ANOVA

Nama contoh uji	Nilai P-Value
Bulk polisakarida Vi	0,0116
Bulk konjugat ViDT	0,0908
Vaksin tifoid konjugat	0,7252

Dari data diatas ketiga contoh uji memiliki nilai signifikansi P-value > 0,05 yang berarti H0 diterima maka hari pengujian tidak mempengaruhi metode.

c. Kekuatan (Robustness)

Parameter ini bertujuan untuk mengukur kemampuan metoda untuk tetap tidak terpengaruh oleh variasi kecil seperti oleh komposisi fase gerak, kondisi pH dan kekuatan ion, suhu dll. Untuk mengukur parameter ini sebelumnya metoda harus memenuhi persyaratan akurasi dan presisi. Metode analisis yang digunakan untuk mengetahui kemampuan metoda tidak terpengaruh oleh variasi inkubasi adalah metode analisis variansi (ANOVA) satu arah, karena variabel bebas yang digunakan hanya variasi inkubasi. Adapun %CV hasil uji robustness variasi inkubasi dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 7
Tabel Hasil Uji Robustness

Nama contoh uji	Variasi inkubasi		
	2 Jam	4 Jam	6 Jam
Bulk konjugat ViDT	1,50	2,14	5,40

Sedangkan untuk hasil analisis menggunakan ANOVA menunjukkan P-value sebesar 0,03935 < 0,05 yang berarti H0 ditolak maka ketiga variasi inkubasi pada metode tersebut terdapat perbedaan secara signifikan.

KESIMPULAN

1. Metode HPAEC-PAD dapat menguji kadar virulensi (Vi) pada produk ruahan polisakarida virulensi (Vi) pada produk ruahan konjugat virulensi- toksoid difteria (ViDT) dan produk akhir vaksin tifoid konjugat dengan kualitas baik dilihat dari hasil parameter validasi yang memenuhi kriteria penerimaan.
2. Kadar virulensi pada produk ruahan polisakarida virulensi (Vi) pada produk ruahan konjugat virulensi- toksoid difteria (ViDT) dan produk akhir vaksin tifoid konjugat sesuai dengan syarat sehingga vaksin ini dapat memberikan perlindungan yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

Alba S, Bakker MI, Hatta M, Scheelbeek PFD, *et al.*. 2016. *Risk Factors of Typhoid Infection in the Indonesian Archipelago*. *PLoS ONE* 11(6): e0155286. doi:10.1371/journal.pone.0155286.

Anonim. (2003). *The Diagnosis, Treatment and Prevention of Thyphoid Fever*. Retrieved Februari 18, 2018, from World Health Organization- Vaccines Document.

Buckle GC, Walker CLF, dan Black RE. 2012. *Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010*. *J Glob Health*. 2(1):10401.

Erman Tritama. 2015. *Development of Typhoid Conjugate Vaccine in Biofarma*. In 9th International Conference on Typhoid and Invasive NTS Disease.

McGregor AC, Waddington CS, Pollard AJ. 2013.

Prospects for prevention of Salmonella infection in children through vaccination.

Curr. Opin. Infect. Dis. 26: 254–262.

Micoli, F., Rondini, S., Pisoni, L., Berti, F., Proietti,

D., Costantino, P., *et al.* (2011). ***CRM 197 As***

A New Conjugate Vaccine Against

Salmonella Thypi. *Vaccine*, 712-720.

Rohrer, J. 2004. ***Analysis of Carbohydrates by***

High Performance Anion- Exchange

Chromatography with Pulsed Amperometric

Detection.