
VALIDASI PENETAPAN ALUMINIUM DALAM VAKSIN COVID-19 DENGAN METODE TITRASI KOMPLEKSOMETRI

Validation of Aluminum Determination in COVID-19 Vaccine by Complexometric Titration Method

Trisna Yuliana¹, Dudung Hermana², Vinca Medica Lestari², Yohanes Susanto Ridwan³

¹Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Informatika, Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi, Indonesia

²Pengujian Mutu Kimia Fisika PT. Biofarma, Bandung, Indonesia

³Pusat Riset Lingkungan dan Teknologi Bersih, Badan Riset dan Inovasi Nasional

e-mail: trisyuliana@lecture.unjani.ac.id

Diterima: 2 Februari, Direvisi: 20 Maret 2024, Disetujui: 2 Juli 2024

Abstrak

Vaksinasi merupakan upaya dalam menangani pandemi *Coronavirus disease* (COVID-19) yang disebabkan oleh *respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2). Pada proses pembuatannya, aluminium ditambahkan ke dalam vaksin yang berfungsi sebagai penjerap. Kadar aluminium harus diperhatikan untuk menjaga keamanan dan kemanjuran vaksin. Kadar yang dimaksud yaitu (0,3 – 0,6) mg/mL. Metode titrasi kompleksometri merupakan metode yang umum digunakan untuk menetapkan aluminium dalam vaksin difteri, vaksin tetanus dan yang lainnya akan tetapi belum pernah dilaporkan pada vaksin COVID-19. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa metode titrasi kompleksometri merupakan metode valid dan andal untuk dapat digunakan pada pengujian kadar aluminium dalam vaksin COVID-19 sehingga dapat digunakan sebagai metode analisis rutin. Hasil penelitian menunjukkan: linearitas/ rentang kerja metode dengan $(r) = 0,9999$. Intra reproduksibilitas (KV) sebesar 3,62% dengan nilai perolehan kembali sebesar $(95,39 \pm 3,17) \%$. Metode titrasi kompleksometri untuk penetapan aluminium dinyatakan cukup tangguh pada variasi penambahan HNO_3 dengan nilai ketidakpastian pengujian sebesar $\pm 0,044$ mg/mL. Hasil validasi menunjukkan metode uji telah memenuhi syarat dan dapat digunakan sebagai metode pengujian rutin pada produksi vaksin COVID-19. Hasil penetapan kadar aluminium pada vaksin COVID-19 berada pada rentang $(0,450 \pm 0,044)$ mg/mL. Dari hasil pengujian kadar aluminium pada batch produksi dan hari yang berbeda, kualitas vaksin COVID-19 menunjukkan hasil yang konsisten.

Kata kunci: Vaksin COVID-19, Penjerap (*adjuvant*) aluminium, Titrasi kompleksometri, Validasi metode

Abstract

Vaccination is an effort to deal with the Coronavirus disease (COVID-19) pandemic caused by respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). In the manufacturing process, aluminium is added as an adjuvant, which level must be maintained to keep vaccine safety and efficacy, i.e. between 0.3 – 0.6 mg/mL. The complexometric titration method is commonly used to determine aluminium in diphtheria, tetanus and other vaccines, but has never been reported for the COVID-19 vaccine. The aim of this research is to confirm that the test method is valid and reliable and can be used as a routine analytical method to perform aluminium level tests in the COVID-19 vaccine. The results showed that the method has met the parameters set in the validation test with a linearity (r) of 0.9999. Intra-reproducibility test results showed an RSD of 3.62% with recovery values of $95.39 \pm 3.17 \%$. The test method for determining aluminium is quite robust to variation of HNO_3 addition volume. The results of determining aluminium levels in the COVID-19 vaccine are in the range of 0.450 ± 0.044 mg/mL. The concentration of aluminium showed consistent results on different production batches and days.

Key words: COVID-19 Vaccine, aluminium Adjuvant, Complexometric Titration, Method Validation.

1. PENDAHULUAN

Coronavirus disease (COVID-19) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus *corona* yang baru ditemukan dengan nama *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2). Virus jenis baru ini ditemukan pertama kali di Wuhan, Tiongkok pada akhir Desember 2019 dan menyebar keseluruh dunia. Berdasarkan data dari WHO, sampai dengan 18 Oktober 2021 COVID-19 sudah menginfeksi 240.260.449 orang dengan angka kematian

sebanyak 4.890.424 orang di seluruh dunia. Oleh karena itu, sampai sekarang masih dilakukan penelitian mengenai vaksin sebagai upaya dalam menangani pandemi ini (WHO, 2021).

PT. Biofarma (persero) sebagai salah satu produsen vaksin dunia, bekerjasama dengan perusahaan dari China yaitu Sinovac dalam pengadaan bahan baku vaksin. Vaksin COVID-19 dari Sinovac berupa *bulk ready to fill*. Pada proses pembuatannya, vaksin tersebut ditambahkan aluminium sebagai adjuvant yang berfungsi untuk membantu memperkuat respon kekebalan tubuh.

Oleh karenanya kadar aluminium harus selalu diperhatikan agar tidak mempengaruhi keamanan dan kemanjuran dari vaksin tersebut (COVID-19, 2020).

Penetapan aluminium dalam vaksin untuk manusia dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti spektrofotometri serapan atom untuk vaksin bayi (May et al., 1984), ICP-AES dan ICP-MS (Schlegl et al., 2015) juga titrasi kompleksometri untuk produk vaksin manusia secara umum (Chawla et al., 2016). Berdasarkan *European Pharmacopeia*, metode standar untuk penetapan kadar aluminium pada vaksin secara umum dapat dilakukan dengan metode titrasi kompleksometri (*European Pharmacopeia*, 2014). Titrasi kompleksometri merupakan metode kuantitatif yang didasarkan pada reaksi pembentukan senyawa kompleks antara ion logam target dengan zat pembentuk kompleks (Day, R. A., & Underwood, 2002). Berdasarkan studi literatur, metode ini sudah pernah dilakukan untuk menetapkan konsentrasi aluminium pada vaksin difteri, vaksin tetanus dan vaksin difteri-tetanus (Meijerman & Van Lier, 1965) dan belum pernah dilaporkan pada vaksin COVID-19. Oleh karenanya penetapan kadar aluminium dalam vaksin COVID-19 dengan metode titrasi kompleksometri perlu dilakukan untuk melihat validitasnya.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Vaksin

Vaksin merupakan sediaan farmasi, mengandung zat *antigenic* yang mampu menimbulkan kekebalan aktif dan spesifik. Vaksin dibuat dengan cara melemahkan bakteri atau menginaktifkan virus liar, atau dengan menseleksi mutan avirulen. Suatu vaksin dikatakan memenuhi syarat jika aman digunakan dan efektif memberikan imunitas untuk tubuh (Tamara, 2021).

Tubuh pada saat kemasukan bahan antigenik akan merespon dengan membentuk zat penangkalnya (antibodi). Mekanisme awal pertahanan tubuh terjadi pada sel darah putih yaitu bagian limfosit dan makrofag. Ketika bahan antigenik masuk akan direpson dan diserap oleh makrofag yaitu pada sel-T, kemudian menyajikan antigen tersebut kepada sel-B untuk “diingat” dan dimusnahkan, sehingga saat tubuh terjangkit bibit penyakit yang sama, akan lebih mudah dikenali dan dihancurkan (Hunter, 2002).

2.2. Penjerap (*Adjuvant*)

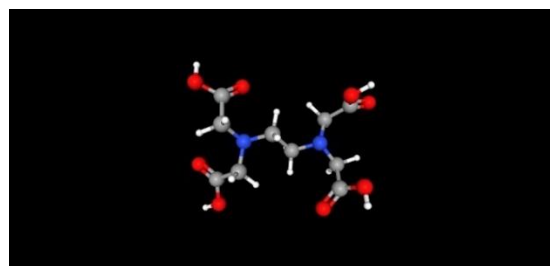
Adjuvant adalah zat yang ditambahkan ke dalam vaksin untuk merangsang dan meningkatkan

daya tahan respon imun, dengan kata lain untuk meningkatkan efektifitas vaksin. *Adjuvant* yang mengandung aluminium telah digunakan selama lebih dari 70 tahun dalam miliaran dosis vaksin, dan memiliki catatan keamanan yang sangat baik (Pulendran et al., 2021). Garam aluminium digunakan sebagai *adjuvant*, berfungsi sebagai pembawa dan pelindung zat antigen dari kontak dengan sistem kekebalan tubuh. Dalam hal ini vaksin akan dilepaskan secara perlahan-lahan (*sustain release*) sehingga respon antibodi menjadi lebih tinggi dan efek imunitas akan lebih lama dalam tubuh (Hunter, 2002).

2.3. Titrasi Kompleksometri

Titrasi kompleksometri merupakan salah satu cara titrasi berdasarkan pembentukan senyawa kompleks antara titran dan titrat. Kompleks atau khelat yang dimaksud di sini adalah kompleks yang dibentuk melalui reaksi ion logam, sebuah kation dengan sebuah anion, atau molekul netral. Ion logam merupakan pusat dari terbentuknya reaksi kompleks dan gugus-gugus yang terikat pada ion pusat disebut ligan (Basset, J., 1994).

Zat pengkompleks yang umum digunakan yaitu larutan *ethylene diamine tetra acetat* (EDTA) Gambar 1. Faktor yang menyebabkan EDTA banyak digunakan sebagai pereaksi titrasi yaitu selalu membentuk kompleks ketika direaksikan dengan ion logam, kestabilan dalam membentuk khelat sangat konstan, sehingga reaksi berjalan sempurna, dapat bereaksi dengan cepat dengan banyak jenis ion logam, mudah diperoleh bahan baku primernya, dan terdapat beragam indikator untuk rentang pH yang digunakan (Day, R.A., 2006).



Gambar 1 EDTA dalam konformasi 3D (Pubchem, 2024).

2.5. Validasi Metode

Menurut SNI ISO/IEC 17025:2017, validasi merupakan suatu konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus dapat dipenuhi. Laboratorium diharuskan memvalidasi metode antara lain: metode tidak baku, metode yang didesain/dikembangkan

laboratorium, metode baku yang digunakan diluar lingkup yang dimaksudkan, metode baku yang dimodifikasi, atau metode baku dengan tujuan untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode tersebut sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan. Setelah proses validasi selesai sistem atau proses tersebut harus tetap dalam keadaan terkontrol selama tidak ada perubahan-perubahan yang dilakukan (Didah Nur Faridah, Dede Erawan, Komar Sutriah, Anwar Hadi, 2018).

Parameter validasi metode yang biasa diukur antara lain:

Kecermatan (Presisi)

Presisi merupakan derajat kesesuaian antar hasil uji yang diperoleh dalam suatu rangkaian pengulangan pengukuran terhadap suatu bahan yang sama. Presisi terbagi atas dua kelompok. Pertama, *repeatability*, yaitu keberulangan yang diperoleh dari personil, bahan, alat dan metode yang sama serta dalam waktu yang relatif pendek. Kelompok kedua adalah reproduibilitas. Reproduibilitas terbagi atas: intra-reproduibilitas yaitu keberulangan yang dihasilkan oleh satu laboratorium yang sama tetapi dengan satu faktor yang berbeda dan; inter-reproduibilitas, yaitu keberulangan yang dihasilkan oleh laboratorium yang berbeda.

Presisi diukur melalui nilai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) oleh karenanya presisi sangat tergantung pada berbagai variasi kondisi baik peralatan, personel, kondisi lingkungan, dan waktu, yang menyumbang pada kesalahan acak hasil uji (Eurachem, 2014).

Ketepatan & Perolehan Kembali (Recovery)

Ketepatan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis terhadap nilai yang sebenarnya di dalam suatu bahan. Ketepatan hasil analisis sangat bergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Untuk mengukur kinerja ketepatan suatu metode diperlukan adanya suatu bahan acuan tersertifikasi (*certified reference material*) atau bahan acuan dengan tingkat kualitas dibawahnya. Keberadaan bahan acuan yang sesuai seringkali sulit untuk diperoleh, oleh karenanya untuk mengukur ketepatan seringkali digunakan parameter perolehan kembali (*recovery*).

Untuk mengukur *recovery* dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (*placebo* atau matriks sampel tanpa analit). Campuran tersebut

kemudian dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit sebenarnya yang ditambahkan. Dalam metode penambahan baku, terhadap sampel dilakukan penetapan analit tertentu, kemudian sejumlah analit yang sama dengan yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dan kemudian dianalisis. Selisih kedua hasil kemudian dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya yang ditambahkan ke dalam sampel.

Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh terhadap hasil yang sebenarnya (Eurachem, 2014).

Perolehan kembali ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\%Recovery = \frac{(CF-CA)}{C^*A} \times 100$$

Dimana:

- CF = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran
- CA = konsentrasi analit dalam sampel
- C*A = konsentrasi analit yang ditambahkan

Linearitas/ Rentang kerja

Linearitas adalah suatu interval di mana metode analisis tersebut memberikan hasil dengan nilai ketidakpastian yang dapat diterima. Titik terkecil suatu linearitas dibatasi oleh batas kuantifikasi (LOQ). Dan titik tertinggi linearitas merupakan konsentrasi di mana terjadi anomali yang signifikan dalam sensitivitas analisis yang teramati (Eurachem, 2014). Linearitas merupakan kemampuan suatu metode analisis yang memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Dan rentang adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit dengan ketepatan dan kecermatan yang dapat diterima (Riyanto, 2014).

Batas deteksi & batas kuantitasi

Batas deteksi merupakan titik terendah konsentrasi analit dalam contoh yang dapat dideteksi tetapi tidak perlu terkuantisasi. Batas kuantitasi atau biasa disebut juga batas pelaporan (*batqs of reporting*) adalah batas konsentrasi terendah analit dalam contoh yang dapat ditetapkan dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat diterima, dibawah kondisi pengujian yang disepakati (Eurachem, 2014).

Ketangguhan (Robustness)

Ketangguhan metode merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk tetap berada dalam kinerjanya walaupun diterapkan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keandalannya. Faktor tersebut antara lain, perubahan suhu, kelembaban, pH, reagen dan yang lainnya.

Pengukuran ketangguhan metode dilakukan dengan cara mengubah sedikit metodologi, dilakukan secara terus menerus, dievaluasi respon analitiknya dan dilakukan evaluasi terhadap efek presisi dan akurasi metode tersebut (Eurachem, 2014).

Ketidakpastian pengukuran

Ketidakpastian pengukuran adalah pengukuran suatu rentang nilai dimana di dalam rentang tersebut diperkirakan nilai benar yang diukur itu berada. Di dalam menghitung ketidakpastian pengukuran, sebagian data yang digunakan menggunakan data hasil validasi metode. Menurut (Eurachem, 2012), langkah – langkah yang perlu dilakukan untuk mengestimasi ketidakpastian pengukuran adalah :

1. Menetapkan model pengujian dan formula untuk mengukur kadar analit.
2. Mengidentifikasi sumber – sumber yang memberikan kontribusi ketidakpastian pada setiap langkah di dalam proses analisis dan digambarkan dalam bentuk diagram tulang ikan.
3. Mengkuantifikasi komponen ketidakpastian. Pada tahap ini, dilakukan dengan mengestimasi besarnya ketidakpastian dari masing – masing komponen yang telah diidentifikasi. Proses kuantifikasi terbagi atas dua kategori yaitu:

- Tipe A

Kategori ini didasarkan pada pekerjaan eksperimental dan dihitung dari rangkaian berulang. Ketidakpastian baku (u) untuk tipe A diperoleh melalui persamaan:

$$u = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Dimana, s adalah simpangan baku dan n adalah jumlah pengamatan.

- Tipe B

Kategori ini didasarkan pada sumber informasi/data yang dapat dipercaya seperti sertifikat. Pada tipe ini simpangan baku yang ada perlu dikoreksi terhadap distribusi probabilitas nilai tersebut. Bila data berdistribusi normal dengan tingkat keyakinan 95% maka ketidak pastian baku diestimasi dengan:

$$u(x) = \frac{s}{2}$$

Untuk data berdistribusi normal dengan tingkat keyakinan 99%, maka ketidakpastian baku diestimasi dengan:

$$u(x) = \frac{s}{3}$$

Untuk kelompok data yang memiliki distribusi *rectangular* yaitu bila rentang nilai memiliki probabilitas yang sama maka ketidakpastian baku diestimasi dengan:

$$u(x) = \frac{s}{\sqrt{3}}$$

Distribusi *triangular* adalah bila suatu sebaran data memiliki rentang dimana terdapat satu nilai yang merupakan nilai terbanyak (modus). Ketidakpastian bakunya diestimasi dengan:

$$u(x) = \frac{s}{\sqrt{6}}$$

Dalam proses menghitung ketidakpastian, perlu diketahui distribusi dari probabilitas dari suatu nilai. Apabila tidak diketahui ataupun tidak disertai dengan keterangan mengenai tingkat keyakinan suatu nilai, maka distribusi datanya diasumsikan *rectangular*.

4. Menghitung ketidakpastian gabungan dari masing – masing komponen.

Terdapat dua aturan dalam menghitung ketidakpastian gabungan yaitu:

- Aturan 1

Untuk suatu model yang melibatkan penjumlahan atau selisih, $y=a+b+c\dots$, maka persamaan yang dipakai:

$$u_c = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2 + \dots}$$

Dimana :

$u(a)$: ketidakpastian baku dari komponen a

$u(b)$: ketidakpastian baku dari komponen b

- Aturan 2

Untuk suatu model yang melibatkan perkalian atau pembagian, $y=abc\dots$, maka persamaan yang dipakai:

$$u_c = y \sqrt{\left(\frac{ua}{a}\right)^2 + \left(\frac{ub}{b}\right)^2 + \dots}$$

Dimana :

u_c = ketidakpastian baku konsentrasi

u_a/a = ketidakpastian suatu komponen a yang dinyatakan sebagai ketidakpastian baku relatif.

5. Menghitung ketidakpastian diperluas
Tahap terakhir adalah mengalikan ketidakpastian baku gabungan dengan faktor cakupan yang dikehendaki hingga diperoleh ketidakpastian yang diperluas, melalui persamaan:

$$U = k \times u_c$$

Dimana,

U : Ketidakpastian baku yang diperluas

k : Faktor cakupan, jika

$k = 2$ untuk tingkat kepercayaan 95%,

$k = 3$ untuk tingkat kepercayaan 99%

u_c : Ketidakpastian baku gabungan

3. METODE PENELITIAN

Prosedur penetapan aluminium dalam vaksin mengacu pada European Pharmacopea (European Pharmacopeai, 2014). Pada tahap awal percobaan, dilakukan pencarian kondisi optimum penetapan aluminium dalam vaksin COVID-19 dengan menggunakan larutan standar aluminium. Tahap berikutnya dilakukan proses validasi metode (Eurachem, 2014). Untuk penetapan parameter kinerja metode linearitas/ rentang kerja, batas deteksi dan batas kuantisasi dilakukan terhadap larutan standar, sedangkan penetapan parameter presisi, perolehan kembali, ketangguhan metode dan pengukuran estimasi ketidakpastian melalui vaksin COVID-19. Data yang diperoleh selanjutnya diolah dengan menggunakan metode statistika.

Material

Bahan yang digunakan antara lain sampel vaksin COVID-19 dari Sinovac, H_2SO_4 pekat, HNO_3 pekat, NaOH 40%, larutan EDTA 0,02M. standar $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, buffer asetat pH 4,4, indikator piridil azo naftol 0,5 %, larutan $CuSO_4$ 0,02M. Semua bahan produk dari Merck Indonesia dan air DM

Instrumentasi

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu labu kjedahl 50 mL, gelas kimia, labu ukur, pipet volume, tip pipet, fume hood, pemanas (Labconco), hot plate stirrer (Thermolyne), automatic titrator (Metrohm 785 DMP Titrimo)

Prosedur

Penetapan Kadar Aluminium dalam Vaksin

Terhadap blanko (air DM) dan contoh uji dipipet masing masing 3,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Kemudian ditambahkan 1 mL H_2SO_4 dan 0,3 mL HNO_3 ke dalam masing-masing labu dan dipanaskan dengan suhu sedang hingga terbentuk asap putih-tebal.

Setelah didinginkan, larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam gelas kimia. Berikutnya ditambahkan 2 tetes metil jingga 0,1% sebagai indikator dan sejumlah NaOH 40% untuk menetralkan pH hingga terbentuk warna jingga-kekuningan. Setelah ditambahkan 5 mL bufer asetat pH 4,4 dan 10 mL EDTA 0,02 M, campuran dididihkan dengan hati-hati selama ± 3 menit. Selanjutnya ditambahkan air DM hingga suhu mencapai (68-80) °C. Dalam keadaan larutan masih panas ditambahkan 7 tetes indikator piridil azo naftol kemudian dilanjutkan dengan titrasi menggunakan $CuSO_4$ 0,02 M hingga terbentuk warna coklat-keunguan. Volume $CuSO_4$ 0,02 M yang dibutuhkan untuk mentitrasi contoh uji dan blanko kemudian dicatat dan kadar aluminium dihitung dengan formula berikut:

$$\text{Kadar Al } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{1}{V_s} (V_{tb} - V_{ts})(f_{CuSO_4})(0,5396)$$

V_{tb} dan V_{ts} merupakan volume titrasi untuk blanko dan untuk sampel; V_s adalah volume sampel; nilai 0,5396 merupakan jumlah Al^{3+} dalam mg yang sebanding dengan 1 mL $CuSO_4$ 0,02M; Faktor $CuSO_4$ merupakan faktor koreksi konsentrasi $CuSO_4$ yang digunakan untuk titrasi terhadap $CuSO_4$ 0,02 M. (European Pharmacopeai, 2014)

Uji Linearitas /Rentang Kerja

Dibuat satu seri larutan standar kerja aluminium dengan 5 (lima) konsentrasi yang berbeda (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,0 mg/mL) (Depkes RI, 2020). Setiap larutan standar ini kemudian ditetapkan kembali kadar aluminiumnya dengan 6 (enam) kali pengulangan. Selanjutnya dibuat kurva yang menghubungkan kadar aluminium teoritis terhadap standar aluminium yang terukur.

Pengukuran Presisi dalam Laboratorium

Uji presisi dalam laboratorium (*repeatability*) dilakukan melalui penetapan kadar aluminium dalam vaksin COVID-19 sebanyak 6 (enam) kali pengulangan. Presisi metode diukur dengan nilai koefisien variasi (KV) (%) hasil percobaan.

Pengukuran Presisi (Intra Reproducibility)

Pengujian intra-reproduksibilitas dilakukan melalui penetapan kadar aluminium dari 3 (tiga) *batch* vaksin yang berbeda, ditetapkan pada tiga hari yang berbeda pula dengan masing masing 3 (tiga) kali ulangan.

Data yang diperoleh diolah dengan metode statistika *Analysis of Variant* (ANOVA) (Farrant, 2009).

Pengukuran Perolehan Kembali (Recovery)

Dilakukan penetapan kadar aluminium masing – masing 6 kali pengulangan terhadap larutan standar aluminium 0,6 mg/mL; sampel vaksin COVID-19 yang telah ditambahkan larutan standar aluminium 0,6 mg/mL dengan rasio 1:1 (*spiked*) dan terhadap Vaksin COVID-19.

Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi autotitrator

Dihitung melalui data kurva kalibrasi linearitas dengan menghitung simpangan baku garis $S_{y/x}$. Batas deteksi diperoleh dengan mengalikan simpangan baku garis $S_{y/x}$ dengan faktor 3 (tiga) dan dibagi dengan slope kurva linearitas, sedangkan batas kuantitasi, simpangan baku garis yang diperoleh dikalikan faktor 10 (sepuluh).

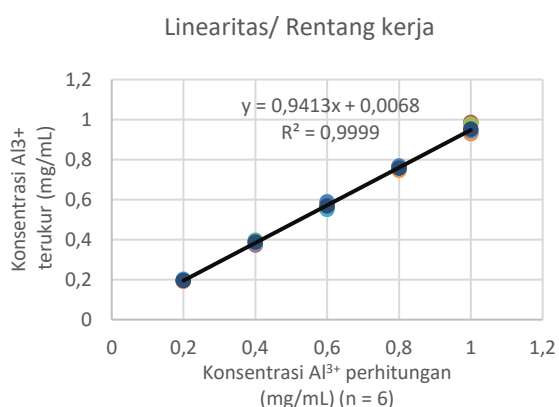
Uji Ketangguhan Metode (Robustness)

Uji ini dilakukan dengan mengubah volume penambahan HNO_3 dari 0,3 mL menjadi 0,1 mL dan 0,5 mL. Masing masing percobaan dilakukan 6 kali ulangan. Hasil yang diperoleh untuk setiap kondisi dievaluasi dengan uji t terhadap kondisi penambahan HNO_3 0,3 mL sebagai acuan

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Linearitas/Rentang Kerja

Linearitas diukur melalui kurva kalibrasi yang menghubungkan konsentrasi Al^{3+} teoritis hasil perhitungan dengan Al^{3+} hasil pengukuran. Hasil percobaan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Kurva linearitas/ rentang kerja.

Persamaan kurva yang diperoleh $y = 0,9413 x + 0,0068$ dan nilai koefisien korelasi 0,9999. Bila dibandingkan terhadap nilai koefisien korelasi Pearson ($n=5$; 95% = 0,878), koefisien korelasi hasil percobaan lebih baik pada taraf signikansi 5%. Presisi untuk setiap titik pengukuran memberikan hasil yang cukup baik yaitu KV (1,22 – 1,60) %.

Dari data kurva didapatkan linearitas/ rentang kerja penetapan Alumunium (0,2 – 1,0) mg/mL.

Batas Deteksi & Batas Kuantitasi

Berdasarkan perhitungan (Danzer, 2010) diperoleh simpangan baku garis ($S_{y/x}$) sebesar 0,00378 mg/mL, sehingga batas deteksi diperoleh sebesar 0,012 mg/mL dan batas kuantitasi sebesar 0,04 mg/mL.

Presisi

Pengukuran *repeatability* dilakukan melalui penetapan kadar aluminium dalam satu *batch* vaksin COVID-19 dengan 6 (enam) kali ulangan. Hasil percobaan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Kadar aluminium dalam vaksin.

Pengulangan ke-	Kadar Al dalam vaksin (mg/mL)
1	0,428
2	0,427
3	0,451
4	0,464
5	0,466
6	0,455
Rata-rata	0,449
Sb	0,0172
%KV	3,83%

Pengujian presisi intra laboratorium dilakukan melalui penetapan kadar aluminium dari 3 (tiga) *batch* contoh vaksin yang berbeda, pada tiga hari yang berbeda dengan masing masing 3 (tiga) ulangan.

Tabel 2 Kadar aluminium dalam Vaksin.

Batch	Kadar aluminium (mg/mL)		
	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3
1	0,459	0,460	0,463
	0,445	0,432	0,468
	0,448	0,477	0,475
2	0,464	0,483	0,419
	0,455	0,461	0,464
	0,459	0,480	0,461
3	0,453	0,462	0,411
	0,455	0,476	0,461
	0,449	0,462	0,458
n	27		
Jumlah	12,360		
Rata-rata	0,458		
Sb	0,017		
KV (%)	3,62		

Tujuan percobaan ini disamping untuk mengukur presisi intra laboratorium juga untuk melihat

Validasi Penetapan Aluminium Dalam Vaksin Covid-19 dengan Metode Titrasi Kompleksometri
(Trisna Yuliana, Dudung Hermana, Vinca Medica Lestari dan Yohanes Susanto Ridwan)

apakah ada perbedaan konsentrasi aluminium dari perbedaan batch produksi vaksin dan perbedaan waktu analisis. Hasil percobaan dapat dilihat pada Tabel 2 dengan n = total jumlah data; Sb = simpangan baku; dan KV (%) yang digunakan untuk mengukur kinerja presisi.

Penetapan kadar aluminium dalam vaksin COVID-19 dengan metode titrasi kompleksometri memberikan presisi, baik *repeatability* maupun intra-laboratorium yang cukup baik karena nilai KV hasil percobaan berturut turut (3,83 & 3,62)% < KV menurut Horwitz (4,24%) (AOAC, 2000).

Melalui pengolahan data dengan statistika ANOVA (Farrant, 2009) diperoleh hasil seperti yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 3 Hasil Pengolahan Data ANOVA.

Sumber Variasi	dk	JK	KT	Fhit	Ftab
Rata - rata	1	5,658	5,658		
Perlakuan:					
Batch (B)	2	0,0002	0,0001	0,26	3,55
Hari (H)	2	0,0009	0,0004	1,17	3,55
Interaksi (BH)	4	0,0015	0,0004	1,51	2,93
Kekeliruan	18	0,0045	0,0003		
Jumlah	27	5,665			

Berdasarkan hasil perhitungan nilai F yang diperoleh untuk perlakuan batch, hari dan interaksinya memberikan nilai F(hit) lebih kecil dibandingkan dengan F(tab) pada tingkat keyakinan 95%. Hal ini menunjukkan metode titrasi kompleksometri dan kualitas vaksin COVID-19 menunjukkan konsistensi yang cukup baik.

Perolehan kembali (Recovery)

Dilakukan melalui penetapan kadar aluminium di dalam sampel vaksin COVID-19 yang telah ditambahkan larutan standar aluminium 0,6 mg/mL dengan rasio 1:1 (*spiked*).

Tabel 4 Hasil Pengukuran Perolehan Kembali.

Kadar Al rata-rata dalam Vaksin (mg/mL)	Kadar Al yang ditambahkan (mg/mL)	Kadar total Al dalam Vaksin (mg/mL)	Recovery (%)
0,449	0,600	1,032	97,25
		1,048	99,92
		1,032	97,25
		1,006	92,92
		1,012	93,92

0,998	91,58
Rata - rata	95,47
Sb	3,17

Penetapan aluminium dilakukan pula terhadap sampel Vaksin COVID-19. Hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 4.

Terlihat nilai *recovery* rata-rata untuk penetapan Aluminium dalam vaksin dengan metode titrasi kompleksometri sebesar 95,47%. Apabila dibandingkan terhadap nilai *recovery* 100%, *recovery* hasil percobaan menunjukkan tidak signifikan melalui uji t.

Ketangguhan (Robustness)

Uji ini dilakukan dengan mengubah volume penambahan HNO₃ menjadi 0,1 mL dan 0,5 mL. Masing masing percobaan dilakukan 6 kali ulangan. Kadar aluminium yang diperoleh untuk setiap kondisi dievaluasi melalui uji t dengan menggunakan kondisi penambahan HNO₃ 0,3 mL sebagai acuan. Hasil percobaan dapat dilihat pada Tabel 5.

Melalui uji t, metode titrasi kompleksometri cukup tangguh untuk perubahan penggunaan HNO₃ 0,1 mL maupun 0,5 mL terhadap penggunaan HNO₃ 0,3 mL karena kadar Aluminium yang diperoleh tidak berbeda nyata pada tingkat keyakinan 95%. Tabel 5 Kadar Al dengan penambahan volume HNO₃ yang berbeda.

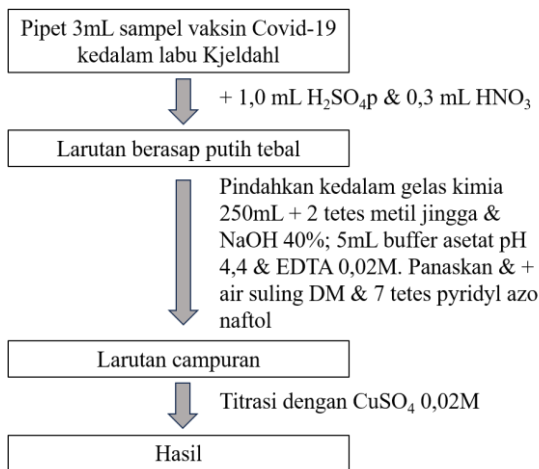
n	Kadar Al (mg/mL)	
	HNO ₃ 0,1 mL	HNO ₃ 0,5 mL
1	0,446	0,455
2	0,432	0,453
3	0,441	0,448
4	0,412	0,460
5	0,405	0,462
6	0,458	0,465
n	6	6
Rata-rata	0,432	0,457
Sb	0,020	0,006
t(hitung)	0,636	0,769
t(tab;95%)	2,571	2,571

Aluminium berpotensi menyebabkan efek samping lokal dan sistemik yang parah termasuk abses steril, *eosinophilia* dan *myofascitis* (Mishra *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil uji ketangguhan metode kompleksometri, kadar aluminium rata rata dalam vaksin COVID-19 (432 dan 457 ug/mL) relatif cukup baik bila dibandingkan dengan kadar aluminium dalam vaksin lain dengan metode yang sama. Mishra *et al.*, 2007 melaporkan kadar

aluminium dalam vaksin DPT (809,4 ug/mL); vaksin hepatitis-B (512,62 ug/mL); vaksin TT (836,4 ug/mL) dan vaksin DT (782,4 ug/mL). Semua kadar aluminium yang dilaporkan telah memenuhi batas atas yang diijinkan dari adjuvant aluminium untuk injeksi pada manusia yaitu 1,25 mg/ dosis sesuai dengan rekomendasi WHO (World Health Organization, 1977).

Perhitungan Estimasi Ketidakpastian

Dengan menggunakan prosedur penetapan aluminium (European Pharmacopeia, 2014) dibuat model sistem pengujian seperti yang tertera pada Gambar 3, rumus yang digunakan dan diagram tulang ikan seperti yang tampak pada Gambar 4.



Gambar 3 Diagram alir pengujian aluminium.

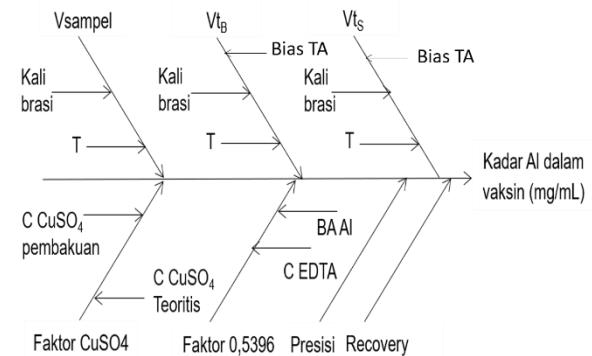
Setiap komponen di dalam diagram tulang ikan tersebut diestimasi ketidak pastian bakunya dan kemudian digabung dengan aturan 2 karena

Tabel 6 Ringkasan Hasil Perhitungan Ketidakpastian.

Sumber	Nilai (x)	(ux)	Satuan	(ux /x)	(ux /x) ²
V _{tB}	10,06	3,70E-03	mL	3,68E-04	1,36E-07
V _s	3,00	1,48E-03	mL	4,93E-04	2,43E-07
V _{tS}	7,64	2,84E-03	mL	3,72E-04	1,38E-07
f CuSO ₄	1,03	4,76E-03		4,62E-03	2,14E-05
f 0,5396	0,54	3,99E-04	mg/mL	7,40E-04	5,47E-07
Recovery	95,39	3,17	%	3,32E-02	1,10E-03
Presisi	1	1,66E-02	mg/mL	1,66E-02	

Nilai ketidakpastian baku relatif keseluruhan diperoleh sebesar 4,89%. Apabila dihitung nilai perbandingan Horwitz (*Horwitz ratio*) diperoleh nilai sebesar 0,77. Nilai ini lebih kecil dari 1, yang menunjukkan bahwa ketidakpastian metode uji lebih baik dari yang diprediksi, yaitu CV Horwitz (Horwitz & Albert, 2006). Hal ini pun menunjukkan bahwa ketidakpastian metode uji berada dalam batas wajar dan metode uji sesuai untuk digunakan pada penetapan Aluminium secara rutin.

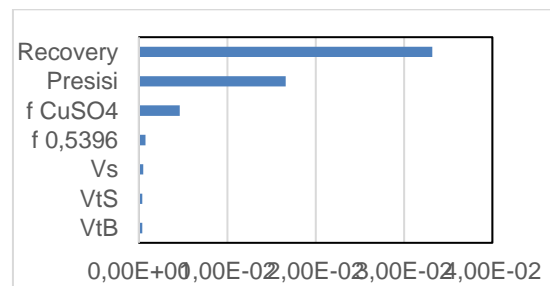
persamaan untuk mengukur konsentrasi Aluminium merupakan perkalian & pembagian (Eurachem, 2012).



Gambar 4 Diagram tulang ikan penetapan aluminium dalam Vaksin COVID-19.

Ringkasan hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 6. Berdasarkan data nilai relatif (u_x / x) pada tabel tersebut dan Gambar 5, *recovery* dan presisi intra laboratorium berturut turut memberikan sumbangan terbesar dalam perhitungan estimasi ketidakpastian. Karena kesalahan dalam presisi ini bersumber pada kesalahan acak dan salah satunya berasal dari operator, maka untuk memperkecil dapat diupayakan dengan meningkatkan keterampilan operator melalui pelatihan.

Berdasarkan nilai yang tercantum pada Tabel 6, konsentrasi aluminium dalam vaksin diperoleh 0,450 mg/mL dengan nilai ketidakpastian diperluas (U) sebesar 0,044 mg/mL ($k = 2$).



Gambar 5 Nilai u_x/x pada penetapan aluminium dalam vaksin COVID-19.

5. KESIMPULAN

Kandungan aluminium dalam vaksin COVID-19 produk Sinovac diperoleh 0,450 mg/mL dan menunjukkan hasil yang konsisten untuk setiap *batch* vaksin yang diproduksi.

Hasil validasi penetapan aluminium dalam vaksin COVID-19 menunjukkan: metode menunjukkan linearitas yang cukup baik dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9999 dan rentang kerja penetapan aluminium (0,2 – 1,0) mg/mL; presisi intra laboratorium (3,62%); batas deteksi dan batas kuantitasi berturut turut 0,012 mg/mL dan 0,04 mg/mL dan *recovery* sebesar 95,47%. Metode kompleksometri untuk penetapan aluminium menunjukkan ketangguhan cukup baik dan memberikan besaran nilai ketidakpastian baku relatif sebesar 4,89%. Dari hasil evaluasi *Horwitz ratio* menunjukkan bahwa metode uji mempunyai performa yang lebih baik dari prediksi. Oleh karenanya dapat disimpulkan bahwa metode titrasi kompleksometri merupakan metode yang valid, andal dan absah untuk dapat digunakan sebagai metode analisis rutin pengujian kandungan aluminium sebagai penjerap (*adjuvant*) dalam vaksin COVID-19.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada PT Biofarma yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International, 17 th ed.*
- Basset, J., Denney, R. C., Jeffery, G. H., & Mendham, J. (1994). Buku ajar vogel kimia analisis kuantitatif anorganik. *Jakarta: EGC.*
- Chawla, A. K., Das, C., Singh, P., Tiwari, M., & Chaudhary, S. (2016). Evaluation of physicochemical properties of aluminium phosphate gel to improve adjuvant activity. *Journal of Current Research in Science, 4*(3), 104.
- COVID-19, C. vaksin. (2020). *Certificate of Analysis (CoA) Vaksin COVID-19. Sinovac.*
- Danzer, K. (2010). *Analytical Chemistry: Theoretical and Metrological Fundamentals.* Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Day, R. A., & Underwood, A. L. (2002). Analisis Kimia Kuantitatif Edisi keenam. In *Jakarta: Erlangga.*
- Day, R.A., U. A. L. (2006). *Analisis Kimia Kuantitatif. Diterjemahkan oleh A.H. Pudjaitmaka* (Kelima). Erlangga.
- Depkes RI. (2020). Farmakope Indonesia edisi IV. In *Departemen Kesehatan Republik Indonesia.*
- Faridah, D. N., Erawan, D., Sutriah, K., Hadi, A., & Budiantari, F. (2018). Implementasi SNI ISO/IEC 17025: 2017 Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi. *Badan Standarisasi Nasional.*
- Eurachem. (2012). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements. *Eurachem/CITAC Working Group: UK., 3.* <https://doi.org/10.3329/jbas.v41i2.35494>
- Eurachem. (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. In *Eurachem Guide, ISBN: 0-94948926-12-0.* <https://eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- European Pharmacopei. (2014). *European Pharmacopei 8.0 volume II.EP.*
- Farrant, T. (2009). *Practical Statistics For The Analytical Scientist: A Bench Guide.* The Royal Society of Chemistry.
- Horwitz, W., & Albert, R. (2006). The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International, 89*(4), 1095-1109. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1095>
- Hunter, R. L. (2002). Overview of vaccine adjuvants: Present and future. *Vaccine, 20*(SUPPL. 3), S7. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00164-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00164-0)
- May, J. C., Progar, J. J., & Chin, R. (1984). The aluminum content of biological products containing aluminum adjuvants: determination by atomic absorption spectrometry. *Journal of biological standardization, 12*(2), 175-183. [https://doi.org/10.1016/S0092-1157\(84\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0092-1157(84)80051-7)
- Meijerman, G. W., & Van Lier, K. L. (1965). Chelometric Determination of Aluminium in Vaccines *. *Bull. Org. Nwnd. Sant), 33,* 27–31.
- Mishra, A., Bhalla, S. R., Rawat, S., Bansal, V., Sehgal, R., & Kumar, S. (2007). Standardization and validation of a new atomic absorption spectroscopy technique for determination and quantitation of Aluminium adjuvant in immunobiologicals. *Biologicals, 35*(4), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.03.003>
- Pubchem diakses 09/05/2024 pukul 7:02 WIB. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6049#section=3D-Conformer>
- Pulendran, B., S. Arunachalam, P., & O'Hagan, D. T. (2021). Emerging concepts in the science

- of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(6), 454-475.
<https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>
- Riyanto, P. D. (2014). Validasi & Verifikasi Metode Uji. *DEE Publish : DIY*.
- Schlegl, R., Weber, M., Wruss, J., Low, D., Queen, K., Stilwell, S., Lindblad, E. B., & Möhlen, M. (2015). Influence of elemental impurities in aluminum hydroxide adjuvant on the stability of inactivated Japanese Encephalitis vaccine, IXIARO®. *Vaccine*, 33(44), 5989–5996.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.103>
- Tamara, T. (2021). Gambaran Vaksinasi COVID-19 di Indonesia pada Juli 2021. *Medical Profession Journal of Lampung*, 11(1), 180-183.
- WHO. (2021). *COVID-19 Weekly Epidemiological Update*.
<https://covid19.who.int/#:~:text=Globally%2C%20as%20of%205%3A54pm,vaccine%20doses%20have%20been%20administered.>
- World Health Organization. (1977). Manual for the production and quality control of tetanus toxoid. Test for Aluminium content. *Revmatologija* 1977, 1:87e8.