

**OPTIMALISASI WAKTU INKUBASI DAN KONSENTRASI PEPSIN  
PADA AKTIVITAS PRODUKSI SERUM ANTI TETANUS**

**M. Ambri Saputra Maelandri dan Rida Emelia**

Politeknik Piksi Ganesha Bandung, Indonesia

E-mail: m.ambri46@gmail.com dan emeliarida1310@gmail.com

**Diterima:**

23 Oktober 2021

**Direvisi:**

10 November  
2021

**Disetujui:**

15 November  
2021

**Abstrak**

Tetanus merupakan penyakit yang disebabkan oleh kuman *Clostridium tetani*. Penyakit ini termasuk mematikan di negara berkembang. Melihat masih tingginya kasus tetanus di negara berkembang serta untuk memberikan pelayanan terbaik dan pengobatan efektif terhadap pasien yang terkena penyakit tetanus, maka diperlukan optimalisasi pada proses pembuatan serum anti tetanus, sehingga dapat meningkatkan kapasitas produksi dan kualitas serum yang dihasilkan. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimalisasi waktu inkubasi dan konsentrasi pepsin pada aktivitas produksi serum anti tetanus. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif dengan teknik pengumpulan data melalui observasi dan studi pustaka. Berdasarkan hasil analisis menggunakan *software* khusus densitometri *Design of Experiment (DoE)* dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS PAGE)* bahwa konsentrasi optimum didapatkan pada sampel anti tetanus ke-7 dengan konsentrasi pepsin sebesar 0,18 % dalam waktu inkubasi 5 jam.

**Kata kunci:** Inkubasi, pepsin, SDS Page, tetanus

**Abstract**

*Tetanus is a disease caused by the bacterium Clostridium tetani. This disease is one of the deadliest in developing countries. Seeing the high number of tetanus cases in developing countries and to provide the best service and effective treatment for patients affected by tetanus, it is necessary to optimize the process of making anti tetanus serum, so as to increase the production capacity and quality of the serum produced. Based on this background, this study aims to determine the optimization of incubation time and pepsin concentration on anti tetanus serum production activity. This research is quantitative descriptive research with data collection techniques through observation and literature study. Based on the results of the analysis using a special densitometry software Design of Experiment (DoE) with the Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) method that the optimum concentration was obtained in the 7th anti tetanus sample with a pepsin concentration of 0.18% in an incubation time of 5 hours.*

**Keywords:** incubation, pepsin, SDS Page, tetanus

--	--

## Pendahuluan

Tetanus adalah penyakit yang disebabkan oleh kuman *Clostridium tetani*, dengan gejala utama *spasme* otot tanpa gangguan kesadaran, disebabkan oleh *tetanospasmin* yaitu eksotoksin yang dihasilkan oleh *Clostridium tetani* (Leman & Tumbelaka, 2016). Menurut Harum, spora *Clostridium tetani* biasanya masuk ke dalam tubuh melalui luka pada kulit disebabkan terpotong, tertusuk, luka bakar, gigi berlubang, atau infeksi pada tali pusat yang biasa dikenal sebagai *tetanus neonatorum* (Harum, 2014). Saat terinfeksi, toksin ini akan dibawa menuju terminal syaraf sehingga menurunkan fungsi sel saraf motorik yang bertanggung jawab mengaktifkan otot secara sadar. Gambaran klinis tetanus diawali dengan kejang otot di sekitar luka, lemah, cemas, gelisah, mudah tersinggung dan sakit kepala, kemudian kaku pada rahang, perut dan punggung yang mengeras serta kesukaran untuk menelan (Ade, 2016).

Penyebaran penyakit tetanus menyebar di seluruh dunia terutama di negara berkembang dengan frekuensi penderita yang bervariasi. Penyakit ini termasuk mematikan di negara berkembang karena telah membunuh kurang lebih 500.000 orang pertahun (Rahmanto & Farhanah, 2017). Menurut WHO penyebab kematian yang diakibatkan *tetanus neonatorum* TN di negara-negara berkembang adalah sebanyak 135 kali lebih tinggi dari pada negara maju. Pada tahun 2007, 2011, dan 2014 diantara jumlah kasus TN di negara-negara ASEAN, Indonesia menempati urutan kedua setelah Philipina, yaitu dengan jumlah penderita lebih dari 100 orang. Disamping itu, tingkat kasus kematian yang diakibatkan penyakit TN di Indonesia cenderung mengalami kondisi yang cukup tinggi di tahun 2014 (Yani & Munawaroh, 2020). Angka kematian (*case fatality rate*) Tetanus neonatorum dari tahun 2007-2011 berada di kisaran angka 48%-61%. Pada tahun 2013 *case Fatality Rate tetanus neonatorum* sebesar 49,6%. Terdapat sebanyak 84 kasus TN yang terjadi di Indonesia pada tahun 2014 dengan kematian mencapai 54 orang atau 64,3% (Sari, 2017).

Penyakit tetanus pernah meningkat di Indonesia saat terjadi tsunami di provinsi Nanggroe Aceh Darussalam pada 26 Desember 2004 silam. Pasien tetanus mencapai 106 kasus dalam kurun waktu yang sangat singkat. Penyebab kematian dilaporkan karena adanya manifestasi klinik peneumonia, dan sarana prasarana kesehatan yang rusak dan hilang selama kurun waktu yang singkat (Prawira, Witari, & Tini, 2018). Hal ini menunjukkan bahwa tetanus dapat terjadi kapan saja, termasuk ketika bencana alam melanda. Penyakit ini menjadi ancaman bagi orang-orang yang berpotensi terinfeksi *Clostridium tetani*, terutama yang tidak menerima vaksin tetanus. Infeksi dapat terjadi akibat tingkat kebersihan yang masih sangat kurang, perawatan luka yang kurang diperhatikan, mudah terjadi kontaminasi, serta kurangnya kesadaran masyarakat terhadap pentingnya kebersihan dan kekebalan terhadap tetanus.

Menurut Leman & Tumbelaka, (2010) bahwa Secara klinis tetanus dibagi menjadi 4 derajat, yaitu derajat I (ringan), derajat II (sedang), derajat III (berat), dan derajat IV (stadium terminal). Pengobatan infeksi penyakit ini dapat dilaksanakan dengan pemberian antibiotik, menetralkan toksin, pemberian obat antikonvulsan dan memberikan perawatan pada luka. Saat ini Indonesia telah memiliki beberapa pilihan untuk netralisasi toxin tetanus yaitu Anti Tetanus Serum (ATS) yang dihasilkan oleh plasma kuda (equine) atau Human Tetanus *Immunoglobulin* (HTIG) yang berasal dari plasma darah manusia. Penggunaan serum merupakan bentuk imunisasi pasif yang diberikan dengan cara menginjeksikan antibodi dalam tubuh sebagai pengobatan atau langkah preventif terhadap infeksi tetanus (Murwani, 2015).

Serum anti tetanus diproduksi dengan cara imunisasi aktif. Hewan donor diimunisasi dengan toksin yang telah dilemahkan, kemudian akan memicu dihasilkannya antibodi pada serum darah yang digunakan untuk melawan toksin yang sebelumnya telah diinjeksikan. Kuda merupakan donor yang sering digunakan karena kapasitas volume darahnya besar, sekitar 8% dari berat tubuh. Kuda memiliki kadar *immunoglobulin G* yang paling tinggi sehingga cocok sebagai hewan donor untuk tujuan penggunaan protein plasma sebagai pengobatan teurapetik (Bertolini, J, Goss, N, Curling, 2013).

Serum merupakan produk farmasi yang tergolong sebagai sediaan *steril*. Sediaan *steril* adalah sediaan yang bebas dari cemaran *mikroba patogen* atau *non patogen*, mikroba *vegetatif* atau *non vegetatif*. Serum anti tetanus berfungsi untuk menetralkan toksin yang diproduksi oleh kuman tetanus, penggunaan serum anti tetanus secara terus-menerus dianjurkan bagi orang yang mudah terserang tetanus dari luka, seperti orang dengan sejarah imunisasi yang tidak lengkap atau status imunisasinya tidak jelas (Sitti Fatmayani Marhaes & Zaenab, 2018). Rute pemberian serum adalah melalui parenteral yang artinya disuntikkan langsung pada membrane kulit atau mukosa, sehingga sediaan ini harus bebas dari kontaminasi mikroba dan toksin serta memiliki kemurnian yang tinggi. Oleh karena itu seluruh bahan, proses yang terlibat langsung dengan produksi sediaan ini harus dapat menjamin sterilitas, dan keamanan.

Proses digestasi enzim pepsin (pepsin asi) merupakan metode untuk memisahkan fragmen F(ab)<sub>2</sub> dari molekul antibodi (Satria Nugraha, 2020). Melalui proses ini didapat (Fab')<sub>2</sub> yang merupakan bagian yang spesifik mengikat antigen sehingga dapat menetralkan racun yang masuk ke dalam tubuh. Melihat masih tingginya kasus tetanus di negara berkembang serta untuk memberikan pelayanan terbaik dan pengobatan efektif terhadap pasien yang terkena penyakit tetanus, maka diperlukan optimalisasi pada proses pembuatan serum anti-tetanus sehingga dapat meningkatkan kapasitas produksi dan kualitas serum yang dihasilkan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimalisasi waktu inkubasi dan konsentrasi pepsin pada aktivitas produksi serum anti tetanus.

## **Metode Penelitian**

### **Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif dengan teknik pengumpulan data melalui observasi dan studi pustaka. Hasil penelitian merupakan deskripsi dari data kuantitatif pada desain penelitian eksperimental yang diperoleh selama observasi. Observasi penelitian dilakukan di Laboratorium QC PT. Bio Farma (Persero)



yang beralamat di Jl. Pasteur No. 28, Pasteur, Kec. Sukajadi, Kota Bandung, Jawa Barat 40161. Penelitian dilakukan selama 2 bulan, yaitu dari bulan April sampai Juni 2021. Penelitian ini meliputi desain penelitian, bahan penelitian, alat penelitian, jalannya penelitian, dan analisis data. Analisis data menggunakan *software* khusus densitometri pada *Design of Experiment* (DoE) dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektroforesis* (SDS PAGE).

### **Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasma kuda anti tetanus, water for injection, stacking buffer, bis acrylamide 30%, resolving buffer, SDS 10 %, TEMED, larutan *coomassie blue*, larutan destaining (asam asetat), APS, tip kuning dan putih, dan microtube.

### **Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu set SDS Page, waterbath, pH meter, timbangan elektrik, beaker glass, gelas ukur, syringe 30 mL, syringe filter 0,22  $\mu$ m, termometer, kulkas suhu 2-8° C, magnetic stirrer, magnetic bar, pipet tetes, tabung falcon 45 mL, stopwatch, vortex, termomixer, gel scanner, densitometry software program, spatel logam, mikropipet (0,1  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 2 mL), poolbox, dan nanodrop spektrofotometer.

### **Jalannya Penelitian**

#### **Pembuatan *design of experiment***

Pembuatan desain eksperimen meliputi proses yang telah diuji menggunakan tujuh sampel. Berikut hasil konsentrasi pepsin pada sampel anti tetanus.

Tabel 1. Hasil konsentrasi pepsin pada sampel anti tetanus

No	Sampel	Waktu	Konsentrasi Pepsin
1.	ATS 1	1 jam	0,12 % (g/ml)
2.	ATS 2	5 jam	0,12 %
3.	ATS 3	3 jam	0,15 %
4.	ATS 4	3 jam	0,15 %
5.	ATS 5	3 jam	0,15 %
6.	ATS 6	1 jam	0,18 %
7.	ATS 7	5 jam	0,18 %

### **Preparasi sampel plasma**

Plasma Kuda anti tetanus dari batch yang sama diencerkan dengan WFI dengan perbandingan 1:2, disiapkan gelas beaker 1000 mL dan diisi 40 mL sampel plasma anti tetanus dan diencerkan dengan 80mL WFI. Kemudian pH sampel disesuaikan dengan pH optimum pepsin asi yang sudah ditentukan yaitu 3,2 dengan menambahkan larutan HCl dan dihomogenkan dengan menggunakan magnetic stirrer.

### **Preparasi pepsinasi**

Proses pepsinasi dilakukan di waterbath dengan suhu inkubasi 37°C dengan waktu inkubasi dan konsentrasi pepsin disesuaikan *Design of Experiment* (DOE). Sampel plasma dimasukkan waterbath hingga suhu sampel mencapai 37°C, kemudian pepsin Bovine ditimbang dan dimasukkan pada sampel. Setelah proses inkubasi selesai, sampel di filter dengan menggunakan syringe filter 0,22  $\mu$ m. Proses pepsinasi dihentikan dengan menaikkan pH sampel menjadi 6,5 dengan NaHCO<sub>3</sub>.

### Pengukuran konsentrasi

Sampel plasma hasil pepsinasi ditentukan konsentrasinya dengan menggunakan Nanodrop Spectrofotometer. Instrumen dinyalakan kemudian dipilih menu protein UV, kemudian dipilih menu Igg Human untuk membaca sampel plasma. Blanko yang digunakan adalah WFI. Sebanyak 2 $\mu$ L sampel diukur dengan Nanodrop Spectrofotometer. Konsentrasi yang didapat digunakan untuk menyeragamkan konten yang akan dimasukkan dalam sumur gel SDS Page.

### Preparasi gel sds page

Gel dibuat dengan menggunakan bahan poliakrilamid. Gel SDS- PAGE dibuat 2 jenis gel yaitu resolving gel dan stacking gel. Resolving gel adalah gel yang berada dibawah dan memiliki pori yang lebih kecil, berfungsi untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Sedangkan stacking gel adalah gel yang berada di atas mempunyai pori yang lebih besar yang berfungsi untuk meratakan dan menyamakan posisi sampel agar dapat bermigrasi secara bersamaan. Gel dibuat dengan menggunakan kaca khusus yang berukuran pendek dan panjang, dan menggunakan cetakan sisir untuk membentuk sumur pada stacking gel yang nantinya akan menjadi tempat meletakkan sampel. Gel yang telah dibuat sebelum digunakan dapat disimpan di dalam buffer running yang mengandung Tris/glycine/SDS.

Tabel 2. Komposisi gel SDS Page

No	Resolving gel		Stacking gel	
1	WFI	1700 $\mu$ L	WFI	975 $\mu$ L
2	Bis Acrylamide	2000 $\mu$ L	Bis Acrylamide	268 $\mu$ L
3	Resolving buffer	1250 $\mu$ L	Resolving buffer	415 $\mu$ L
4	SDS 10 %	50 $\mu$ L	SDS 10 %	50 $\mu$ L
5	APS (Ammonium Persulfat )	70 $\mu$ L	APS (Ammonium Persulfat )	20 $\mu$ L
6	TEMED	10 $\mu$ L	TEMED	3,5 $\mu$ L

### Preparasi sampel SDS Page

Sampel plasma hasil pepsinasi yang telah diukur konsentrasinya dengan menggunakan Nanodrop Spectrofotometer ditentukan volume yang akan dimasukkan pada sumur gel SDS Page dengan menyamakan konten. Dengan perhitungan yaitu Konten ( $\mu$ g) = Konsentrasi x Volume Sampel ( $\mu$ L). Kemudian siapkan microtube untuk masing-masing sampel. SDS- PAGE yang digunakan pada percobaan ini adalah SDS-PAGE Non-Reducing yaitu tidak menggunakan mercaptoethanol. Sampel dimasukkan pada microtube kemudian ditambahkan buffer sampel sebanyak 2 x volume sampel, kemudian ditambahkan WFI sebagai pelarutnya, dengan volume total setiap sampel 10  $\mu$ L, dengan konten 20  $\mu$ g. Sampel kemudian divortex selama 7 detik menggunakan mini spin dan dipanaskan menggunakan thermo mixer dengan suhu 70°C selama 10 menit. Kemudian sampel terlebih dahulu dimasukkan ke dalam mini spin untuk memastikan tidak ada sampel yang masih menempel di dinding *microtube*.

### Running sds page

Set alat SDS Page disiapkan yang terdiri dari chamber, buffer DAM, buffer running, sumber tegangan, gel yang telah dibuat dan sampel. Gel dipasang pada chamber kemudian

chamber diisi dengan menggunakan buffer running hingga merendam seluruh gel. Bagian sumur berada diatas. Kemudian dimasukkan ladder atau marker protein sebagai tanda sebanyak 3  $\mu$ L. Sampel dimasukkan pada sumur dengan menggunakan mikropipet sebanyak 10  $\mu$ g. Setelah selesai chamber ditutup dan dialiri arus listrik dari anoda ke katoda. tegangan yang digunakan 100 V dengan waktu 110 menit.

### ***Staining and gel***

Gel kemudian diangkat dari chamber dan dilepaskan dari kaca untuk dipotong pada bagian sumur. Kemudian gel dicuci dengan WFI dan direndam dalam larutan staining yang berisi *coomassie blue* selama 1 jam dengan bantuan roller mixer agar proses pewarnaan merata. Kemudian gel didistaining selama 2 jam dengan bantuan roller mixer.

### **Analisis Data**

Gel yang sudah diwarnai kemudian di scan dengan menggunakan UV Scanner. Kemudian hasil scan dianalisis menggunakan software khusus densitometri untuk melihat ukuran pita-pita protein setelah dilakukan proses pepsinasi.

### **Pengujian Titer Plasma**

Pengujian nilai titer plasma berfungsi untuk mengetahui kadar potensi dari suatu antibodi. Pengujian titer dilakukan dengan prinsip pembentukan flokulan (metode flokulasi) dengan mereaksikan antigen dengan antibodi. Antibodi direaksikan dengan antigen (toksoid tetanus) dalam NaCl 0,85 % fisiologis. Kemudian reaksi dipercepat dengan bantuan panas. Penghitungan nilai titer antibodi menggunakan satuan Lf (Limit of Flocculation) yang menyatakan jumlah toksoid yang direaksikan dengan 1 IU (*International standard Antitoxin*). Waktu yang diperlukan untuk terbentuk flokulan pertama (Kf) menunjukkan indikator pada kualitas antigen dan antibodi (Coombs, Rigsby, Sesardic, & Stickings, 2016).

### **Hasil dan Pembahasan**

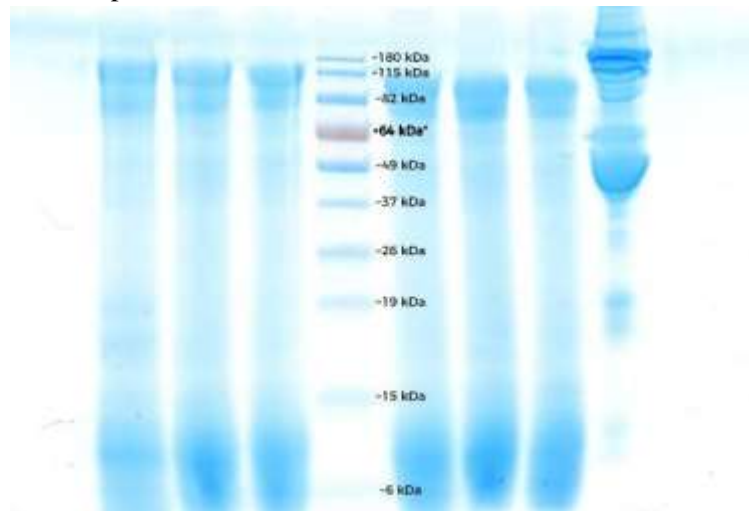
Proses pembuatan fragmen poliklonal antibodi untuk tujuan pengobatan dilakukan melalui beberapa step design dalam perkembangannya untuk meningkatkan efektifitas dan mengurangi efek samping dari produk antibodi. Proses pembuatan serum anti tetanus yang berasal dari kuda dilakukan dengan mengimunitasi hewan donor dengan racun yang telah dilemahkan secara berulang dan terjadwal, hingga mendapatkan potensi atau titer yang tinggi untuk diproduksi sebagai serum. Hewan donor kemudian diambil darahnya dan dipisahkan plasma dengan sel-sel darah yang lain.

Pepsin merupakan protease yang dapat memotong antibodi menjadi fragmen-fragmennya. Dalam memproduksi serum anti tetanus atau anti venom yang lain fragmen yang dituju adalah (Fab') yang merupakan bagian yang spesifik mengikat antigen sehingga dapat menetralkan racun yang masuk kedalam tubuh. Fragmen crystallizable (Fc) merupakan fragmen yang berfungsi sebagai situs pengenalan sel-sel efektor yang spesifik (Mentari, 2018). Dilaporkan bahwa keberadaan Fc dan protein agregat dapat menimbulkan efek samping dalam penggunaan serum yang berasal dari kuda (equine). Pepsin dapat memotong antibody menjadi fragmen (Fab')<sub>2</sub> dan Fc dengan cara memutus secara spesifik ikatan amida dengan terminal N dari asam amino aromatic seperti (*fenilalanin, tirosin* dan *triptofan* sehingga residu asam amino hasil hidrolisis dengan pepsin diharapkan memiliki berat molekul yang lebih kecil (Hermanto. S., Sumarlin. L.O., Fatimah. W., 2013).

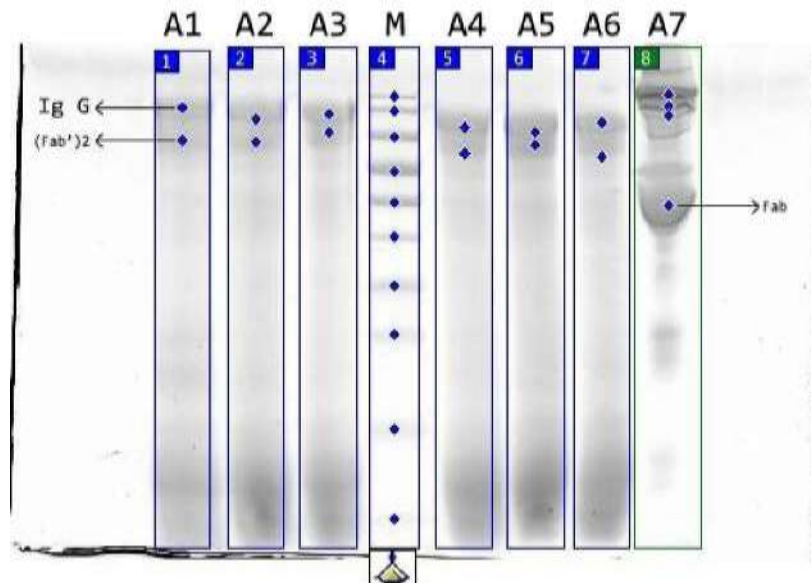




Percobaan ini dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi pepsin yang digunakan dan waktu inkubasi plasma. Respon yang diamati adalah luasan area (Fab')<sub>2</sub> dengan menggunakan SDS PAGE dan Densitometri serta respon titer plasma dengan menggunakan uji flokulasi. Pepsin yang digunakan adalah pepsin Bovine, plasma diatur pH 3,2 dengan penambahan HCl dan suhu inkubasi 37°C. Proses pepsinasi dihentikan dengan menaikkan pH menjadi 6,5 menggunakan NaHCO<sub>3</sub>. Berdasarkan hasil SDS PAGE, dapat diamati di tiap line terapat pita-pita protein yang diduga merupakan IgG ± 150 kDa, (Fab')<sub>2</sub> ± 110 kDa dan Fab ± 55 kDa. Berikut gambar gel SDS Page setelah di Scan dan hasil densitometri selama percobaan di PT Bio Farma:



Gambar 1. Gel SDS Page setelah di Scan (Percobaan di PT Bio Farma)



Gambar 2. Hasil densitometri (Percobaan di PT Bio Farma)

Berdasarkan densitometri, didapatkan luas area (Fab')<sub>2</sub> setiap sampel yaitu:



Tabel 3. Luasan (Fab')<sub>2</sub> hasil densitometri

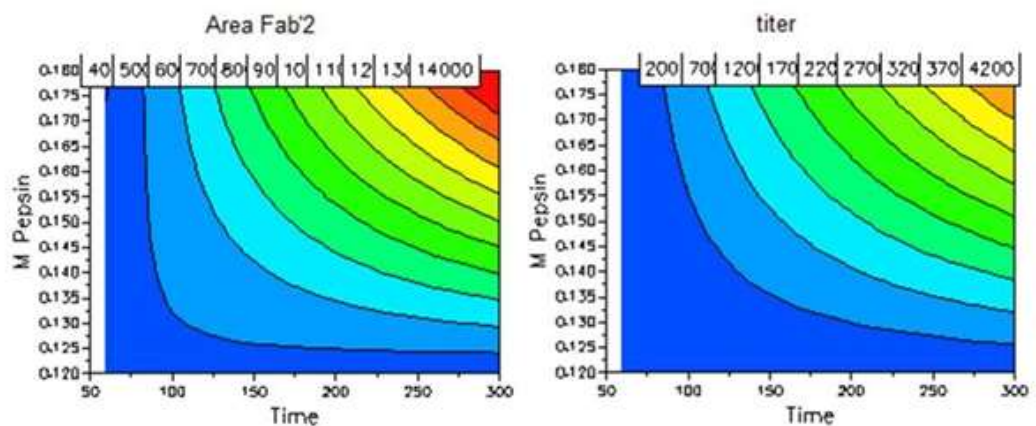
Sampel	Luas (Fab') <sub>2</sub> (Pixel)
A1	5.980
A2	5.292
A3	6.298
A4	4.824
A5	6.030
A6	4.992
A7	16786 (Fab) = 13.244 dan (Fab') <sub>2</sub> = 3.542

Berdasarkan analisis titer menggunakan uji flokulasi, diperoleh titer plasma setelah proses pepsinasi sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil uji titer plasma ATS

No	Sampel	Titer (LF)
1	Sebelum	240
2	A1	240
3	A2	260
4	A3	260
5	A4	260
6	A5	220
7	A6	220
8.	A7	5000

Berdasarkan tabel di atas, pada A7 sampel plasma dengan konsentrasi pepsin 0,18 % dan inkubasi selama 5 jam diperoleh nilai titer yang sangat tinggi. Analisis menggunakan design of experiment dilakukan dengan menggunakan *software mode*. Faktor yang dimasukkan adalah konsentrasi pepsin dan waktu inkubasi. Sedangkan respon yang hendak diamati yaitu luasan area (Fab')<sub>2</sub> dan nilai titer plasma. Kemudian dapat dilihat interpretasi hasil analisis design of experiment.



Gambar 3. Area Fab'2 dan titer plasma pasca pepsinasi (PT Bio Farma)

Dari grafik diatas diperoleh hasil area merah merupakan hasil pepsinasi optimum yang diperoleh, dapat diamati bahwa A7 menggambarkan respon yang paling optimum namun dengan luas (Fab'<sup>2</sup>) yang sebetulnya kecil. Luasan area yang diduga Fab memberikan gambaran linear dengan hasil titer yang didapatkan. Dugaan penulis konsentrasi pepsin 0,18 % dengan waktu inkubasi 5 jam menyebabkan (Fab')<sup>2</sup> terpotong lagi menjadi Fab dengan berat molekul ± 55 kDa. Hal itu kemungkinan dapat terjadi saat pepsin memotong ikatan disulfida yang menghubungkan antar Fab. Fab merupakan antibody binding site dengan dengan satu sisi perlekatan antigen (monovalen). Fragmen (Fab')<sup>2</sup> karena memiliki berat molekul yang lebih besar, penggunaannya pun akan lebih efektif dilihat dari prinsip toxin serta farmakokinetik dan farmakodinamik, waktu paruh dari (Fab')<sup>2</sup> lebih lama. Penggunaan Fab dalam netralisasi suatu toxin memiliki karakteristik yaitu cepat dieliminasi oleh tubuh karena memiliki berat molekul yang lebih rendah, Fab akan sangat efektif dalam menetralkan toxin atau neurotoxin dengan berat molekul rendah yang akan cepat di distribusi dan cepat dieliminasi dari tubuh, seperti racun kalajengking dan laba-laba (World Health Organization, 2017).

### **Kesimpulan**

Proses Pepsinasi dilakukan dengan mengoptimalkan pH di 3,2 dan suhu inkubasi 37°C, kemudian diberi pepsin sebagai enzim protease, kemudian dihentikan aktivitas enzim dengan menaikkan pH menjadi 6,5 menggunakan NaHCO<sub>3</sub>, kemudian dianalisis hasil pepsinasi dengan menghitung titer ATS dan analisis area (Fab')<sup>2</sup> dengan menggunakan SDS PAGE. Konsentrasi optimum didapatkan pada sampel Anti Tetanus ke 7 dengan konsentrasi pepsin sebesar 0,18 % dengan waktu inkubasi 5 jam.

### **Bibliografi.**

- Ade, Siam Wulandari. (2016). *Laporan Tugas Akhir Asuhan Kebidanan Komprehensif Pada Ny. " A " G2p1001 Dengan Anemia Ringan Wilayah Kerja Puskesmas Graha Indah Balikpapan.*
- Bertolini, J, Goss, N, Curling, J. (2013). Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use. In *Proteomics* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1002/pmic.201370099>
- Coombes, Laura, Rigsby, Peter, Sesardic, Dorothea, & Stickings, Paul. (2016). Collaborative study for the calibration of a replacement International Standard for diphtheria toxoid for use in flocculation test. *Biologicals*, 44(6), 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.07.005>
- Harum, Aroma. (2014). Dental Caries as a Risk Factor of Tetanus. *Jurnal Medula*, 3(02),
- Hermanto. S., sumarlin. L.O., Fatimah. W. (2013). Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis. *Analytical Chemistry*, 24(12), 1949–1952. <https://doi.org/10.1021/ac60072a021>
- Leman, Martinus M., & Tumbelaka, Alan R. (2016). Penggunaan Anti Tetanus Serum dan Human Tetanus Immunoglobulin pada Tetanus Anak. *Sari Pediatri*, 12(4), 283–288.
- Mentari, Anoraga Mona Larasati Sekar. (2018). *Engaruh Cheral Terhadap Kuantitas Relatif Sel Natural Killer, Tnf-A Dan Ifn-Γ Pada Mencit (Mus Musculus) Model Kanker Payudara.* Malang: Universitas Brawijaya.
- Murwani, Sri. (2015). *Dasar-dasar Mikrobiologi veteriner.* Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Prawira, Tu Bagus Adnan Angga, Witari, Ni Putu, & Tini, Kumara. (2018). Faktor–faktor yang berhubungan dengan luaran klinis pasien tetanus di RSUP Sanglah pada bulan

- Januari 2018–Oktober 2019. *Metode*, 2019.
- Rahmanto, Danawan, & Farhanah, Nur. (2017). *Faktor-Faktor Risiko yang Berpengaruh pada Kematian Pasien Tetanus di RSUP Dr. Kariadi Semarang*. Faculty of Medicine.
- Sari, Selvy Novita. (2017). Risk Analyses Factor of Infant Mortality Caused by Tetanus Neonatorum in East Java. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 5(2), 231–239.
- Satria Nugraha, Reza. (2020). *Optimalisasi Proses Digestasi Enzim Pepsin pada Serum Anti Difteri Menggunakan SDS PAGE*.
- Sitti Fatmayani Marhaes, Penulis, & Zaenab, Sitti. (2018). *Pengaruh Pemberian Imunisasi Dpt Terhadap Perubahan Suhu Tubuh Pada Bayi Usia 3–12 Bulan Di Puskesmas Poasiakota Kendari Provinsi Sulawesi Tenggara Tahun 2018*. Sulawesi Tenggara: Poltekkes Kemenkes Kendari.
- World Health Organization. (2017). *Guidelines for the production*, (Vol. 148).
- Yani, Wine Frindi, & Munawaroh, Madinah. (2020). Sikap Ibu, Dukungan Suami dan Peran Tenaga Kesehatan Berhubungan dengan Pelaksanaan Imunisasi TT Ibu Hamil. *Jurnal Ilmiah Kebidanan Indonesia*, 10(02), 34–41.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).