

**PENERAPAN PURIFIKASI HORMON
ERITROPOETIN DALAM INDUSTRI FARMASI
PT DAEWOONG INFION**



Disusun oleh :
Kelompok Biologi XI MIPA 4

SMA Katolik St. Louis 1
Jl. Polisi Istimewa No. 7, Keputran, Kec. Tegalsari, Surabaya 60265
Telp 031-5676522, 5677494, 5681758 Fax (031)5686494
Email smakstlouis@gmail.com
Website www.smakstlouis@gmail.com

2021

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas karunia-Nya, laporan yang berjudul “*Penerapan Purifikasi Hormon Eritropoetin dalam Industri Farmasi PT Daewoong Infion*” dapat diselesaikan dengan baik dan tepat waktu.

Adapun tujuan dari penulisan laporan studi ekskursi ini adalah untuk mempelajari metode purifikasi pada proses pembuatan obat epodion. Dalam pembuatan obat epodion, penerapan metode kultur jaringan dan purifikasi memiliki peranan penting untuk menghasilkan satu obat yang berkualitas dan steril. Itulah mengapa sangat penting bagi kita untuk mendapatkan pengetahuan baru mengenai pentingnya proses purifikasi melalui studi ekskursi ini.

Laporan ini telah selesai penulis susun atas bantuan dari pihak-pihak yang terkait. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dra. Sri Wahjoeni Hadi S. selaku Kepala SMA Katolik St. Louis 1 Surabaya dan Penanggung Jawab kegiatan Studi Ekskursi 2021
2. F. Asisi Subono, S.Si, M.Kes selaku Wakasek Kurikulum SMA Katolik St. Louis 1 Surabaya
3. Eko Sugiharto, S.Si, M.Kes. selaku Guru Bidang Studi Biologi Kelas XI Tahun Ajaran 2020/2021
4. Anastasia Rina Wiasdianti, S.Pd., M.Hum. selaku Pembimbing dan Guru Bidang Studi Bahasa Indonesia Kelas XI Tahun Ajaran 2020/2021
5. Benedicta V. P. K. W., S.Pd selaku Pembimbing dan Guru Bidang Studi Bahasa Inggris Kelas XI Tahun Ajaran 2020/2021
6. Ibu Julita, S.Si., Apt. selaku narasumber dari PT Daewoong Infion
7. Orang tua dan teman-teman yang telah mendukung dalam penyusunan laporan studi ekskursi ini

Demikian yang dapat kami sampaikan, semoga laporan studi ekskursi ini dapat membantu dalam memahami proses purifikasi khususnya pada hormon eritropoietin di bidang farmasi. Namun, penulis juga sadar bahwa makalah ini

masih memiliki banyak kekurangan, maka dari itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk meningkatkan kualitas makalah pada penulisan selanjutnya.

Surabaya, Februari 2021

Penulis

LEMBAR PENGESAHAN

Karya ilmiah yang berjudul “Penerapan Purifikasi pada Hormon Erythropoietin dalam Industri Farmasi PT Daewoong Infion” yang disusun oleh kelompok studi ekskursi biologi XI MIPA 4.

Surabaya, 20 Februari 2021

Menyetujui,

Guru Bidang Studi
Bahasa Indonesia,



Anastasia Rina Wiasdianti, S. Pd.,
M.Hum.

Guru Bidang Studi
Biologi,



Petrus Eko Sugiharto,
S. Si, M. Kes.

Guru Bidang Studi
Bahasa Inggris,



Benedicta V. P. W., S.Pd

PENYUSUN

Daftar nama anggota kelompok penyusun studi ekskursi biologi XI MIPA 4 :

- | | |
|----------------------|----------------|
| 1. Gelwin Alfito | XI MIPA 4 / 09 |
| 2. Jesselyn Wijaya | XI MIPA 4 / 14 |
| 3. Juanda Santoso | XI MIPA 4 / 15 |
| 4. Kenley Nathanael | XI MIPA 4 / 16 |
| 5. Kevin | XI MIPA 4 / 18 |
| 6. Liesl Amanda | XI MIPA 4 / 19 |
| 7. Michelle Neomi | XI MIPA 4 / 25 |
| 8. Shelfinna | XI MIPA 4 / 30 |
| 9. Vincent Nathanael | XI MIPA 4 / 34 |

ABSTRACT

Shelfinna, Amanda, L., Wijaya, J, et al. (2021). *Penerapan Purifikasi Hormon Eritropoetin dalam Industri Farmasi PT Daewoong Infion*

In human health life, biology has played an important role, especially in the field of pharmacy, which can help the production of drugs to support human health. Daewoong Infion Ltd. is an Indonesian-South Korean joint pharmaceutical company that specializes in biotechnology, specifically cell culture, for the medicine production. One of the medicine that the Daewoong Infion Ltd. manufactured was epodion, which contains erythropoietin as in its active form. Erythropoietin is a peptide-based hormone that has the ability to stimulate the production of erythrocytes, which is also known as erythropoiesis. Under normal body conditions, the erythropoietin hormone is mostly produced by the kidneys, and the rest is the liver. Erythropoietin also has sugar addition on its molecular shape, therefore it is known as a glycoprotein enzyme.

In the production of recombinant human erythropoietins, many contaminants are byproducts of cell culture mixed in erythropoietin, such as bacteria, viruses, endotoxins, stem cell metabolic waste, etc. If contaminants are not eliminated, there is a potential hazard for drug recipients. The drugs produced, apart from being free from contaminants, must also be pure from dimers and other particles. Therefore, the purification process is absolutely required to eliminate contaminants and maintain the purity of the desired proteins. The particular reason of this study is to examine the processes of purification. This is done by examining the successive procedures in which erythropoietin is purified. After purification, results show a significant decrease in concentration of impurities. To sum up everything that has been stated, the process of purification performed an indispensable role in eliminating impurities in order to get the purest form of erythropoietins.

Keywords : erythropoietin, biotechnology, purification.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	
LEMBAR PENGESAHAN.....	i
PENYUSUN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
BAB I Pendahuluan.....	1
Latar Belakang.....	1
Rumusan Masalah.....	2
Tujuan.....	2
Manfaat.....	3
Metode Pengumpulan Data.....	3
BAB II Gambaran Umum Perusahaan.....	4
Sejarah Berdirinya PT Daewoong Infion.....	4
Visi dan Misi.....	5
Struktur Organisasi.....	6
BAB III Pembahasan.....	7
Pengertian Hormon Eritropoetin.....	7
Mekanisme Pembuatan Obat Epodion.....	8
Mekanisme Proses Purifikasi dalam Memproduksi Obat Epodion.....	10
Obat Epodion.....	19
BAB IV Penutup.....	21
Kesimpulan.....	21
Saran.....	21
CITATION.....	22
LAMPIRAN.....	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Logo perusahaan.....	4
Gambar 2.2 Struktur Organisasi.....	6
Gambar 3.1 Hormon Eritropoetin.....	8
Gambar 3.2 Hamster Cina.....	9
Gambar 3.3 Proses Purifikasi.....	10
Gambar 3.4 Kromatografi Afinitas.....	12
Gambar 3.5 Diafiltrasi.....	13
Gambar 3.6 Kromatografi Adsorpsi.....	15
Gambar 3.7 Pertukaran Ion.....	16
Gambar 3.8 Kromatografi Campuran.....	17
Gambar 3.9 Diafiltrasi.....	18
Gambar 3.10 Nanofiltrasi.....	19
Gambar 3.11 Obat Epodion.....	20

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sejak awal abad ke 20 sampai sekarang, berbagai penyakit baru terus bermunculan. Contoh penyakit tersebut antara lain, penyakit pes yang disebabkan oleh bakteri dari tikus, virus SARS, virus H5N1 (flu burung). Tidak lama kemudian, pada tahun 2010 ditemukan penyakit Ebola dan MERS yang sangat bahaya, dan juga virus Covid-19 yang muncul di akhir tahun 2019. Di sisi lain imun tubuh manusia tidak lagi kuat untuk melawan berbagai patogen baru tersebut yang mungkin disebabkan oleh evolusi virus. Selain karena evolusi virus, gaya hidup manusia yang kurang peduli akan kesehatannya juga berdampak pada menurunnya imun tubuh, seperti tidak memperdulikan kandungan gizi yang dikonsumsi, gaya hidup yang kurang baik, tidak cukup istirahat, dan berbagai faktor lainnya. Selain itu, penyakit-penyakit tersebut juga muncul dikarenakan ketidakmampuan tubuh untuk memproduksi senyawa-senyawa tertentu yang vital untuk kinerja tubuh.

Karena ketidakmampuan tubuh tersebut, maka tubuh membutuhkan obat-obatan untuk membantu tubuh dalam memproduksi senyawa tersebut. Selain itu, kondisi penyakit yang disebabkan oleh virus dan bakteri yang terus berevolusi membuat para industri farmasi terus mengembangkan obat-obatan. Salah satu metode krusial untuk dapat membuat obat secara efisien dalam menangani penyakit adalah dengan menggunakan metode kultur jaringan. Metode kultur jaringan merupakan metode untuk memperbanyak sel hewan, dari hasil perbanyakan sel tersebut dapat diolah menjadi obat-obatan yang berkualitas.

Pada prosesnya, obat-obatan yang sudah dihasilkan melalui metode kultur jaringan akan dilanjutkan dengan proses purifikasi yang bertujuan untuk mensterilkan obat-obatan dari berbagai virus dan endotoksin sebelum diedarkan ke masyarakat. Metode purifikasi ini merupakan serangkaian

proses mengisolasi jenis protein tertentu yang kita ingin kita dapatkan. Metode ini sangat penting dalam proses pembuatan obat karena selama proses kultur jaringan, sel hewan mengalami metabolisme untuk kelangsungan hidupnya, sehingga bila dibuat menjadi obat akan terdapat banyak zat pencemar (zat toksin) yang mampu menurunkan kualitas hasil akhir protein (produk).

Oleh karena itu, kegiatan studi ekskursi ini dapat menjadi media pembelajaran untuk memahami lebih dalam ilmu pengaplikasian metode purifikasi dalam produksi obat-obatan. PT Daewoong Infion menjadi salah satu perusahaan farmasi yang telah menerapkan proses purifikasi untuk mensterilkan obat epodion sebelum diedarkan ke masyarakat. Dengan demikian, wawasan mengenai metode purifikasi yang diberikan dapat diterapkan dalam kehidupan sehari - hari, khususnya dalam kemajuan produksi obat-obatan di Indonesia.

B. Rumusan Masalah

1. Apa itu hormon eritropoetin?
2. Bagaimana mekanisme pembuatan obat epodion?
3. Bagaimana mekanisme proses purifikasi pada hormon eritropoetin?
4. Apa pengertian, manfaat dan efek samping dari obat epodion?

C. Tujuan

1. Untuk mendeskripsikan tentang hormon eritropoietin.
2. Untuk memahami mekanisme pembuatan obat epodion.
3. Untuk memahami mekanisme proses purifikasi pada hormon eritropoetin.
4. Untuk menjelaskan pengertian, manfaat, dan efek samping dari obat epodion

D. Manfaat

1. Siswa dapat mengetahui tentang hormon eritropoietin dan perannya dalam tubuh.
2. Siswa dapat memahami mekanisme pembuatan obat epodion.
3. Siswa dapat memahami mekanisme proses purifikasi pada hormon eritropoietin.
4. Siswa dapat mengetahui pengertian, manfaat, dan efek samping obat epodion

E. Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data yang dilakukan untuk membuat laporan studi ekskursi biologi ini adalah wawancara, observasi, dan literasi. Kegiatan pengumpulan data ini dilakukan secara daring melalui media ZOOM *meeting* dengan narasumber PT Daewoong Infion, yang merupakan salah satu perusahaan yang bergerak di bidang farmasi. Observasi dilakukan dengan mengamati penjelasan, presentasi, serta video-video mengenai proses pembuatan obat epodion yang ditampilkan dan dijelaskan oleh narasumber. Kegiatan wawancara dilakukan diakhir penjelasan melalui sesi tanya jawab dengan Bu Julita, S.Si., Apt. selaku narasumber dari PT Daewoong Infion. Semua informasi yang didapat dari kegiatan tersebut kemudian diperdalam kembali secara literasi dengan mencari informasi tambahan mengenai proses purifikasi obat-obatan dari internet.

BAB II

GAMBARAN UMUM PERUSAHAAN

A. Sejarah Berdirinya PT Daewoong Infion

Didirikan pada tahun 1945, Daewoong Pharmaceutical Co, Ltd adalah salah satu perusahaan farmasi terdepan di Korea dan menjadi bagian dalam 50 besar perusahaan kesehatan global pada tahun 2020. Untuk mengembangkan bisnis dan menjadi grup perusahaan kesehatan yang mendunia, Daewoong telah menggunakan strategi lokalisasi dengan memperluas partner global dan membangun beberapa cabang perusahaan di Asia, termasuk di Indonesia.



Gambar 2.1 Logo Perusahaan

PT Daewoong Pharmaceutical Company Indonesia, sebagai anak perusahaan Daewoong Pharmaceutical Co, Ltd didirikan pada tahun 2005. Sejak didirikan telah berkontribusi terhadap kesehatan masyarakat Indonesia dengan memasarkan dan mendistribusikan obat-obatan, serta alat kesehatan berlisensi dan berkualitas tinggi serta berkontribusi untuk pendidikan dibidang ilmu kesehatan di Indonesia.

Pada tahun 2012, PT Daewoong bekerjasama dengan PT Infion, telah mendirikan PT Daewoong Infion bertujuan untuk mengembangkan Industri Obat Biologi, dengan memberikan transfer teknologi dan memproduksi obat Biologi pertama di Indonesia yang berkualitas tinggi untuk masyarakat Indonesia.

PT Daewoong Infion sudah bergerak sejak tahun 2015, tetapi perusahaan ini baru menjual produk pada tahun 2017, yaitu “*epodion*” yang merupakan obat untuk membantu tubuh menyuplai hormon eritropoietin yang seharusnya dapat diproduksi sendiri oleh tubuh manusia. Obat *epodion* ini biasanya ditujukan untuk orang yang mengalami gagal ginjal, penderita kanker yang mengalami anemia, dan terutama untuk orang-orang yang kekurangan hormon eritropoietin. Sehingga obat *epodion* ini dapat membantu menjaga kadar hormon eritropoietin yang dibutuhkan oleh tubuh untuk dapat menghasilkan sel darah merah (eritrosit).

B. Visi dan Misi

Dalam suatu perusahaan, memiliki visi dan misi yang jelas merupakan hal yang sangat penting agar suatu perusahaan memiliki fondasi yang kuat untuk tetap bisa mewujudkan tujuan awal dibentuknya perusahaan tersebut. Fondasi yang kuat ini diharapkan oleh perusahaan akan memberikan dampak yang signifikan pada peningkatan keuntungan dan kemajuan perusahaan. Begitu pula, PT Daewoong Infion.

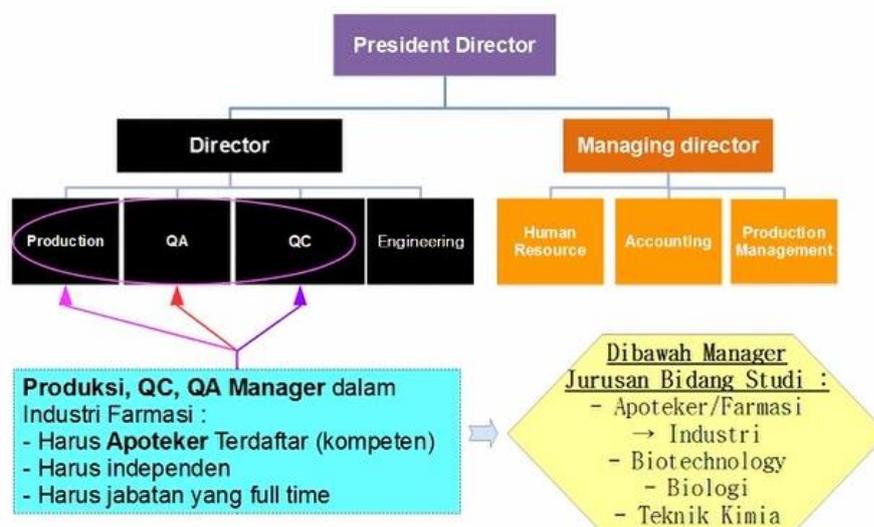
Adapun visi PT Daewoong Infion adalah menjadi perusahaan kesehatan global yang mengutamakan kualitas kehidupan manusia. Visi tersebut menunjukkan bahwa PT Daewoong Infion fokus pada peningkatan kesehatan global melalui produksi obat-obat yang berkualitas dengan memperhatikan bahan baku serta proses pengolahan obat.

Begitu pula, misi PT Daewoong Infion adalah memberikan solusi total yang paling bermanfaat dalam bidang farmasi dan memberikan layanan yang berkontribusi terhadap peningkatan kualitas kehidupan konsumen yang bernilai. Berdasarkan misi tersebut, PT Daewoong Infion ingin membawa dampak positif dalam bidang farmasi melalui obat yang diproduksi sehingga dapat meningkatkan kesehatan konsumen.

C. Struktur Organisasi

Bagi PT Daewoong Infion, struktur organisasi menjadi hal yang penting untuk bisa menjalankan perusahaan ini. Struktur organisasi ini dimulai dari direktur presiden, lalu bercabang menjadi direktur dan *managing director*. Kemudian bagian direktur dibagi lagi menjadi beberapa manager jurusan beberapa bidang studi, diantaranya adalah bagian produksi, *QA*, *QC*, dan *engineering*.

Ada persyaratan khusus pula bagi masing-masing direktur bidang produksi, *QA*, dan *QC* yang bekerja pada perusahaan ini, yaitu Ia harus seorang apoteker terdaftar (kompeten), lalu harus independen atau tidak memiliki kepemilikan di perusahaan ini, dan juga bekerja full time atau tidak ada pekerjaan lainnya. Syarat tersebut benar-benar harus diperhatikan karena di perusahaan ini benar-benar membutuhkan ketelitian dan keahlian dalam memproduksi obat yang akan diedarkan agar benar-benar aman dan tidak berakibat fatal. Terakhir, dibawah direktur ada beberapa manager yang diperlukan keahliannya dalam bidang studi apoteker/farmasi, industri, bioteknologi, biologi, dan teknik kimia. *Managing director* juga dibagi menjadi tiga yaitu mengurus pada bidang *human resource*, akuntansi, dan manajemen produk.



Gambar 2.2 Struktur Organisasi

BAB III

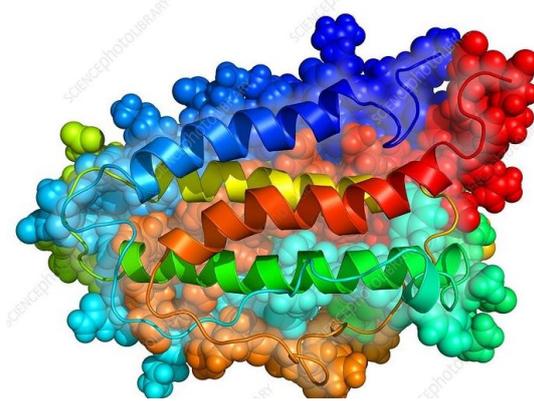
PEMBAHASAN

A. Pengertian Hormon Eritropoetin

Tubuh manusia dalam keadaan normal akan memproduksi hormon eritropoietin dengan alami yang dihasilkan dari organ ginjal. Hormon eritropoietin merupakan hormon peptida endogen terglisasi dalam tubuh manusia yang berperan dalam stimulasi pembentukan sel darah merah. Dimana Human Erythropoietin (hEPO) ini berupa glikoprotein rantai tunggal yang terdiri dari 165 asam amino dengan berat molekul sekitar 30-34 kilo-dalton.

Hormon eritropoietin dihasilkan 90% oleh sel interstitial peritubular korteks ginjal dan sisanya oleh hati, meskipun semua sel pada dasarnya memiliki kemampuan mentranskrip gen eritropoietin dalam kondisi hipoksia (Koury et al., 1989). Produksi EPO oleh hati terutama terjadi pada periode janin dan perinatal dan 49 produksi oleh ginjal mendominasi selama masa dewasa (Ifeanyi and Uzoma, 2016).

Erythropoietin (EPO) merupakan regulator utama produksi eritrosit sebagai respon terhadap penurunan oksigenasi pada jaringan (Jelkmann, 2013) Hormon ini berfungsi untuk menstimulasi diferensiasi hemositoblas menjadi sel darah merah (hemoglobin). Hormon ini diregulasi oleh banyak faktor seperti sistem RAAS (angiotensin II), laju metabolisme dan respon hipoksia. Pada dasarnya sistem ini berhubungan dengan peningkatan kebutuhan oksigen pada tubuh. Hormon eritropoietin ini akan dilepaskan ke dalam darah oleh ginjal hingga hormon tersebut sampai ke sum-sum tulang untuk digunakan dalam proses produksi sel darah merah yang baru.



Gambar 3.1 Hormon Eitropoietin

B. Mekanisme Pembuatan Obat Epodion

Kekurangan hormon eritropoietin pada penderita penyakit gagal ginjal kronis menjadi penyebab utama anemia non regeneratif. Salah satu obat berbasis bioteknologi yang dapat digunakan untuk mengatasi penyakit ini adalah *human erythropoietin* (hEPO). hEPO diklasifikasikan menjadi *epoetin alfa* (39% oligosakarida), *epoetin beta* (24% oligosakarida), dan *epoetin omega* (21% oligosakarida), klasifikasi ini dibedakan atas perbedaan struktur kimia dan metode pembuatannya dimana perbedaan struktur kimia terdapat pada kadar oligosakarida, namun demikian tidak terdapat perbedaan dalam efikasi dan farmakologinya.

Epodion merupakan salah satu obat yang berfungsi untuk menyuplai hormon eritropoietin dalam tubuh yang bertujuan untuk menjaga kadar hormon eritropoietin yang dibutuhkan oleh tubuh untuk dapat menghasilkan sel darah merah (eritrosit). Obat epodion ini biasanya ditujukan untuk orang yang mengalami gagal ginjal, kanker, anemia, dan terutama untuk orang-orang yang kekurangan hormon eritropoietin.

Dalam memproduksi obat epodion, PT Daewoong Infion menggunakan ovarian cells of Chinese hamster (CHO) yang dapat mensintesis *epoetin alpha* dan *epoetin beta* melalui DNA rekombinan. DNA rekombinan merupakan sebuah teknik untuk menginsersi DNA yang diinginkan kedalam sel inang, yang kemudian sel ini dikembangkan

melalui proses kultur jaringan. Cara untuk melakukan insersi DNA yaitu pertama, DNA yang diinginkan dengan menggunakan DNA komplementer dan enzim seluler seperti ligase, topoisomerase, helikase dan lain-lain. Setelah didapatkan DNA yang diinginkan, dilakukan insersi kedalam sel inang (sel CHO). Setelah proses insersi, akan dilakukan penyeleksian akan sel yang mengandung DNA rekombinan. Dari hasil yang telah terseleksi, akan diperbanyak melalui kultur jaringan.

CHO sel yang dipilih oleh PT Daewoong Infion ini merupakan sel ovarian hamster cina, karena sel ini merupakan mamalia protein yang bagus yang berupa *continuous cell line* sehingga dapat hidup lebih lama, serta dapat dilakukan modifikasi protein sesuai yang diinginkan sehingga ketika sel ini diberikan media dapat menghasilkan kembali protein rekombinan berupa EPO (erythropoietin) yang sesuai dengan tujuan pembuatan obat nanti.



gambar 3.2 Chinese Hamster

Pada proses pembuatan EPO, sel hewan ini dimodifikasi melalui dua proses utama. Proses yang pertama adalah proses perbanyakan atau disebut sebagai *upstream processing* dan proses purifikasi atau biasa disebut *downstream processing*. Proses *upstream* bertujuan memperbanyak sel dengan memperhatikan kurva pertumbuhan bakteri yang berkembang pesat pada fase log(4-5 hari). Proses *upstream* ini dimulai dengan culture I dengan menggunakan botol T-Flask lalu dilanjutkan dengan culture II

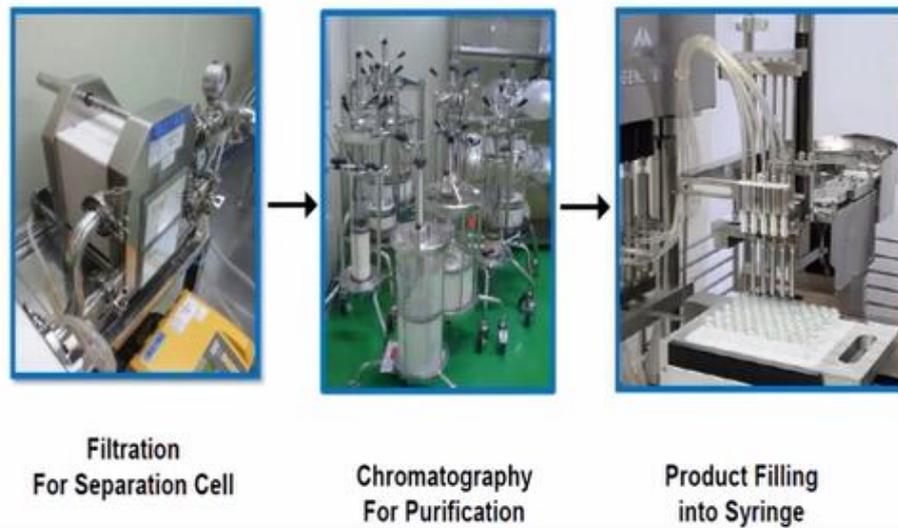
menggunakan *roller bottle*, kemudian masuk tahap main culture untuk *main cultivation* dan mengekspresikan EPO.

Setelah CHO sel mengalami perbanyakan sel hingga jumlah yang diinginkan, akan dilanjutkan dengan proses purifikasi yang bertujuan untuk pemurnian protein yang akan dihasilkan untuk dijadikan obat agar terhindar dari berbagai virus dan endotoksin.

C. Mekanisme Proses Purifikasi pada Hormon Eritropoetin

Dalam proses produksi eritropoietin, banyak senyawa kontaminan yang tercampur dalam EPO. Kontaminan tersebut dapat berupa bakteri, virus, endotoksin, sisa metabolisme sel induk, dsb. Bila kontaminan tidak dieliminasi, maka akan berpotensi bahaya bagi penerima obat. Obat yang diproduksi, selain bebas dari kontaminan, juga harus bersifat murni dari dimer, dan partikel lain agar tidak berbahaya bagi kesehatan konsumen.

Menurut KBBI, Purifikasi memiliki makna “pembersihan”. Dalam bidang farmasi, proses purifikasi dapat diartikan suatu proses mensterilkan obat dari berbagai senyawa kontaminan. Oleh karena itu, proses purifikasi sangat penting untuk diterapkan dalam proses produksi obat sebelum obat diedarkan ke masyarakat.



gambar 3.3 proses purifikasi

Proses purifikasi merupakan perpaduan antara filtrasi dan kromatografi yang kemudian akan dilanjutkan dengan *product filling*. Proses purifikasi ini terdiri atas 7 tahap. Tiap tahap purifikasi di check jumlah protein dalam EPO tersebut. Proses purifikasi ini akan menghasilkan EPO murni yang disebut dengan API.

1. Purifikasi 1 (Kromatografi Afinitas)

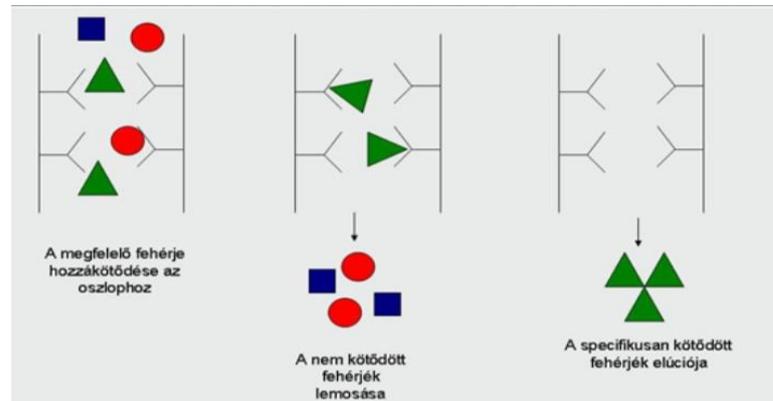
Kromatografi afinitas adalah suatu teknik pemurnian yang dilakukan berdasarkan afinitas enzim atau protein terhadap biomolekul lain, misalnya enzim terhadap inhibitor, substrat atau produknya, afinitas antibodi terhadap antigennya, atau afinitas hormon terhadap reseptornya. Proses ini dilakukan dengan menginjeksi sampel ke dalam kolom afinitas dengan adanya fase gerak (dengan pH yang tepat) dan komposisi pelarut untuk ikatan solut (zat terlarut) dengan ligan. Sehingga, pada proses kromatografi afinitas terhadap hormon erythropoietin ini dilakukan dengan menggunakan cairan *Affi Gel Blue Resin*. Proses kromatografi afinitas ini akan membuang kotoran utama dalam hormon erythropoietin seperti protein sel inang, DNA, bahan warna

tak dikenal, dan lain-lain akan tersingkirkan. Sehingga, protein yang terpilih yaitu protein yang telah terikat dengan suatu ligan.

Dalam biokimia dan farmakologi, ligan merupakan molekul kecil pemicu sinyal yang terikat ke sebuah daerah ikatan pada protein target. Arti dari purifikasi afinitas ini sendiri merupakan pemurnian dengan satu tahap (*one step purification*), yang memerlukan interaksi spesifik antara protein rekombinan dengan suatu ligan. Pemisahan pada tahap satu ini pun terjadi karena interaksi-interaksi biokimiawi yang sangat spesifik.

Proses yang paling umum dilakukan adalah dengan melakukan tahap elusi gradien. Fase pertama yaitu, fase gerak lemah pada kolom afinitas yang disebut dengan buffer aplikasi. Dimana pada fase ini, senyawa-senyawa yang komplemen dengan ligan afinitas akan berikatan karena sampel dilewatkan kolom dengan buffer aplikasi. Sedangkan, sampel-sampel lain yang tidak terikat akan melewati kolom tanpa tertahan, karena selektivitas interaksi solut-ligan yang tinggi dan komponen tersebut akan tercuci dari kolom. Setelah itu, solut yang tertahan akan melalui proses elusi dengan menggunakan pelarut yang dapat mengeluarkannya dari kolom atau yang dapat memecah senyawa kompleks ligan-solut tersebut. Dimana, pelarut elusi ini disebut sebagai fase gerak yang kuat atau biasa disebut buffer elusi yang akan mengeluarkan solut yang dikehendaki. Sehingga istilahnya pada proses buffer elusi ini memurnikan protein yang sudah terpilih dengan memisahkan semua molekul dari kekhususan tertentu dan minimum harus ada dua senyawa yang berikatan spesifik.

Zat-zat yang terisolasi oleh kromatografi afinitas diantaranya adalah enzim substrat, kofaktor, antibodi antigen, virus, polisakarida, glikoprotein lektin, asam nukleat. Keterbatasan metode ini adalah protein rekombinan yang akan dimurnikan harus berinteraksi secara spesifik dengan suatu ligan. Jadi, jika tidak diketahui ligan yang dapat berinteraksi secara spesifik maka tidak dapat dilakukan pemurnian satu tahap.



Gambar 3.4 Kromatografi Afinitas

2. Purifikasi 2 (Diafiltrasi)

Diafiltrasi adalah teknik purifikasi yang menggunakan ultrafiltrasi membran untuk melepas, mengganti, atau menurunkan konsentrasi garam atau pelarut dari larutan yang mengandung protein, peptida, asam nukleat, dan biomolekul lainnya. Ultrafiltrasi membran merupakan membran dengan ukuran pori-pori sangat kecil, pada proses diafiltrasi obat epodion digunakan ultrafiltrasi membran dengan ukuran 10kD membran. Pada dasarnya diafiltrasi adalah proses pengenceran dan dilakukan bersamaan dengan proses konsentrasi

Diafiltrasi memanfaatkan permeabel filter membran untuk memisahkan komponen solusi dan penangguhan berdasarkan mereka ukuran molekul. Membran ultrafiltrasi mempertahankan molekul yang lebih besar dari pori-pori membran sementara molekul yang lebih kecil seperti sebagai garam, pelarut dan air, dengan bebas melewati membran. Proses pemisahan ini didasarkan pada perbedaan sifat afinitas adsorpsi dari komponen sampel pada permukaan padatan aktif.

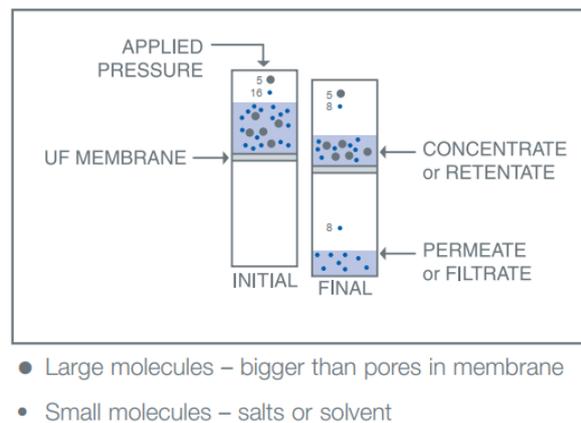
Proses diafiltrasi bertujuan untuk menghilangkan garam, mengkonsentrasi dan pemurnian hormon erythropoietin, serta pertukaran buffer. Keuntungan dari proses diafiltrasi ini adalah hormon EPO yang didapatkan akan memiliki kemurnian yang tinggi dibandingkan proses

konvensional lainnya, dan juga minim risiko kehilangan sampel atau kontaminasi.

Gambar 3.5 Diafiltrasi

3. Purifikasi 3 (Kromatografi Adsorpsi)

Kromatografi adsorpsi merupakan kromatografi kolom yang didasarkan pada perbedaan sifat adsorpsi dari adsorben terhadap komponen-



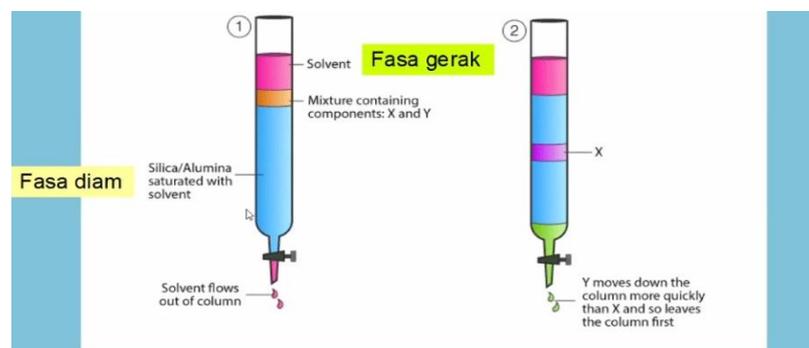
komponen yang akan dipisahkan. Pada proses kromatografi adsorpsi ini juga digunakan resin sebagai media cairan untuk membantu proses kromatografi adsorpsi. Resin yang digunakan oleh PT Daewoong Infion untuk proses kromatografi adsorpsi ini adalah HA Resin dengan ukuran 33-49 kDa.

Pada dasarnya proses kromatografi ini terdiri dari atas fase diam dan fase gerak. Fase diam merupakan kondisi cairan yang dimasukkan dalam tabung titrasi yang sudah diisi dengan filter untuk penyaringan. Sedangkan fase gerak merupakan kondisi dimana cairan yang tadi akan terdorong oleh cairan/gas pemberat yang kita letakkan diatas. Hal ini akan membuat cairan resin tadi dapat bergerak menuruni filter yang sebelumnya sudah ditempatkan.

Faktor-faktor yang mempengaruhi kekuatan adsorpsi diantaranya adalah macam adsorben, macam zat yang diadsorpsi, konsentrasi, luas permukaan adsorben, temperatur, dan tekanan. Adsorben yang digunakan berbentuk butiran-butiran dengan ukuran garis tengah tertentu. Semakin kecil ukuran adsorben maka akan sangat menguntungkan, karena luas permukaan akan

semakin besar sehingga adsorben aktif dan senyawa kontaminan yang diabsorpsi akan semakin banyak pula. Konsentrasi yang besar dan temperatur yang rendah juga akan memperkuat daya adsorpsi.

Proses Kromatografi adsorpsi dipengaruhi oleh kekuatan ikatan antara solut dengan adsorben, dan kekuatan untuk memisahkan solut dari adsorben. Proses kromatografi adsorpsi ini bertujuan untuk menghilangkan eritropoietin yang teragregasi, mengumpulkan eritropoietin protein sel inang, serta membuang senyawa - senyawa dengan polaritas serta afinitas yang berbeda.



Gambar 3.6 Kromatografi Adsorpsi

4. Purifikasi 4 (Kromatografi Pertukaran Ion)

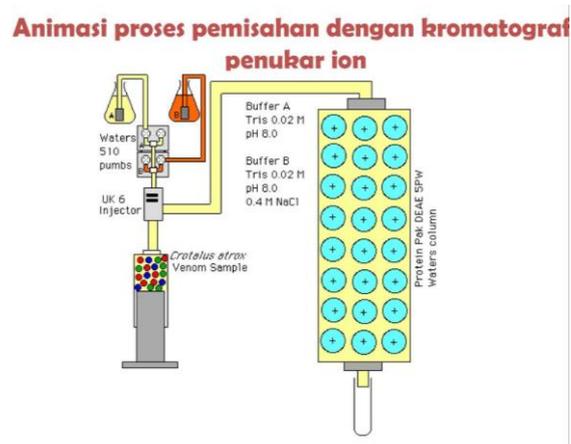
Kromatografi pertukaran ion memisahkan senyawa menurut sifat dan tingkat muatan ion. Ada dua jenis pertukaran ion, yakni pertukaran kation yang saat fase diam bermuatan negatif dan pertukaran anion saat fase diam bermuatan positif. Fasa gerak terdiri dari sistem buffer atau penyangga yang berperan untuk memisahkan senyawa campuran. Sedangkan fase diam biasanya dibuat dari matriks organik yang bersifat inert dengan gugus fungsi terionisasi yang membawa ion bermuatan berlawanan yang dapat dipindahkan.

Pada proses ini, resin kromatografi yang digunakan berupa DEAE Resin 36-49 kDa. Resin penukar anion memiliki muatan positif yang digunakan untuk menahan dan memisahkan senyawa yang bermuatan

negatif, sedangkan resin penukar kation memiliki muatan negatif dan digunakan untuk memisahkan molekul bermuatan positif.

Pada kromatografi ini terdapat beberapa tahap, yaitu yang pertama adalah *Equilibration*, yaitu fasa diam sebagai medium pertukaran ion yang akan disetimbangkan dengan buffer. Lalu tahap yang kedua, *Sample Application*, dimana protein dengan muatan berlawanan berikatan dengan fasa diam terkonsentrasi pada kolom. Selanjutnya, tahap *Elution* yang akan meningkatkan kekuatan ionik buffer untuk menggantikan protein yang terikat pada fasa diam dan juga peningkatan kekuatan ionik lebih lanjut sehingga menyebabkan protein yang bermuatan lebih tinggi lepas dari fasa diam. Tahap yang terakhir adalah *Washing*, yaitu peningkatan kekuatan ionik menghilangkan semua protein yang terikat pada fasa diam sebelum penyetimbangan kembali. Sehingga, tujuan dari proses ini adalah untuk mengumpulkan hormon erythropoietin yang murni.

Pada tahap ini, pengotor isoform dasar seperti HCP, DNA dikeluarkan, serta semua jenis virus dihilangkan. HCP bisa terbentuk dari host ekspresi seperti *e.coli*, ragi, atau sel-sel. Jika pengotor HCP masuk ke dalam tubuh pasien, maka yang akan terjadi reaksi imunologis atau toksik yang merugikan. Oleh karena itu, proses kromatografi penukar ion ini perlu diperhatikan agar segala jenis pengotor dan virus dapat dihilangkan.

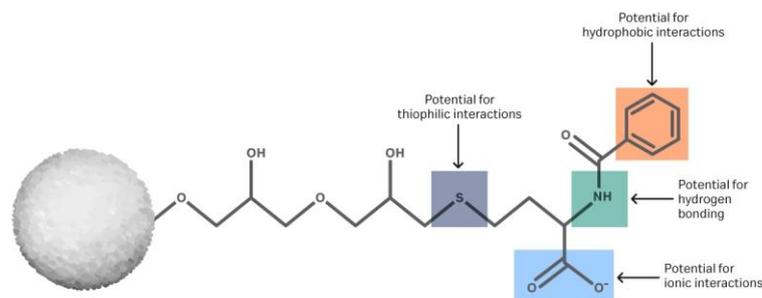


Gambar 3.7 Kromatografi Pertukaran Ion

5. Purifikasi 5 (Kromatografi Mode Campuran)

Kromatografi mode campuran adalah teknik kromatografi cair yang digunakan untuk pemurnian protein dan biomolekul lainnya. Dalam tahap ini, pengotor isoform dasar seperti HCP dan DNA dikeluarkan. Metode ini menggunakan capto resin sebagai media utama untuk melakukan kromatografi. Resin kromatografi mode campuran memiliki selektivitas tinggi. Resin yang digunakan berupa high-flow agarose matrix yang berisikan ligand untuk berikatan secara spesifik dengan protein target. Capto resin merupakan media yang berfungsi sebagai buffer, yang berarti penukar kation mode campuran dengan sifat penukar kation lemah. Pada proses ini, ligan yang dimobilisasi ke capto resin akan berinteraksi dengan hormon erythropoietin melalui berbagai jenis interaksi; seperti interaksi ionik dan hidrofobik. Sifat hidrofobik inilah yang dipakai dalam pembuangan agregat dari suatu protein. Sedangkan HCP dibuang oleh modulator fase bergerak. HCP bisa terbentuk dari host ekspresi seperti *e.coli*, ragi, atau sel-sel.

Pada intinya, tahap kromatografi mode campuran ini dilakukan pada kondisi dengan pH tinggi yang menghasilkan retensi produk yang kuat dalam resin protein. Sehingga, pada tahap ini senyawa protein dimurnikan biomolekulnya yang sangat sulit dipisahkan bahkan pada tahap kromatografi lainnya.

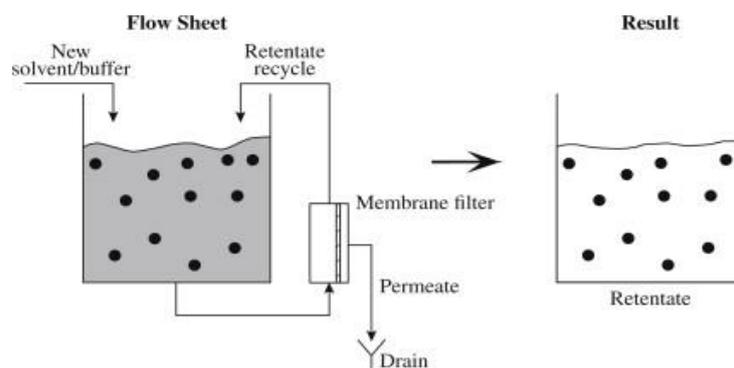


Gambar 3.8 Kromatografi Campuran

6. Purifikasi 6 (Diafiltrasi)

Proses diafiltrasi ini menggunakan filter dengan ukuran 10kD membran. Diafiltrasi ini berfungsi menukar *buffer* untuk menghasilkan formulasi akhir. Diafiltrasi ini dilakukan dengan memisahkan larutan yang mengandung zat terlarut dengan berat molekul tinggi dan rendah.

Diafiltrasi kedua ini dilakukan dalam arah berbalikan dari diafiltrasi yang pertama. Selain itu, aliran retensi untuk kembali ditutup agar aliran kembali hanya melalui arah yang berbalikan. Diafiltrasi kedua bertujuan untuk memaksimalkan hasil produksi dengan ‘membersihkan’ saluran retensi sekaligus memfilter garam - garam dan senyawa - senyawa tidak diinginkan yang terlarut dengan cara dialiri pelarut. Dalam batch yang bagus, 98% erythropoietin yang tersangkut dalam saluran retensi dapat dikeluarkan. Namun, tahap diafiltrasi buffer ini juga berpotensi mengencerkan erythropoietin yang dihasilkan. Sehingga perlu dikontrol waktu diafiltrasi buffer dan jumlah pelarut yang digunakan untuk mempertahankan kualitas erythropoietin tanpa pengenceran yang berlebih.

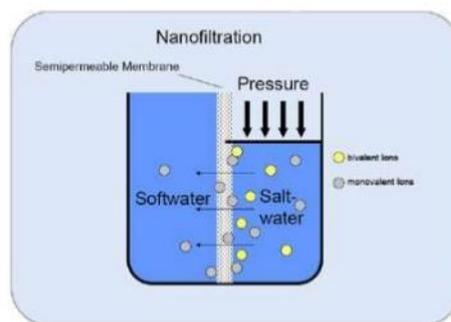


Gambar 3.9 Diafiltrasi

7. Purifikasi 7 (Nanofiltrasi dan Filtrasi Akhir)

Nanofiltrasi dan filtrasi akhir ini bertujuan untuk menghilangkan virus, partikel dan mikroba. Nanofiltrasi ini memang sudah sejak dahulu digunakan untuk melakukan pemurnian yang nantinya akan dapat menyisihkan zat organik seperti polutan mikro dan ion multivalent dengan

menggunakan membran dengan ukuran pori sekecil 15nm. Nanofiltrasi dapat berupa nanofiltrasi larutan yang mengandung eritropoietin pada konsentrasi 0,5 hingga 2 mg / ml dalam buffer pH 6,5 hingga 7,5 yang mengandung 10mM hingga 50mM fosfat dan 50mM hingga 200mM natrium klorida. Proses nanofiltrasi ini bekerja dengan metode pemisahan yang merupakan gabungan antara mikrofiltrasi dan ultrafiltrasi menggunakan pori berukuran 1 nanometer. Nanofiltrasi biasanya dilewatkan secara berurutan melalui dua filter yang terdiri dari filter 0,2 μm dan filter 0,1 μm atau melalui filter 0,2 μm + 0,1 μm yang dilengkapi dengan filter 0,2 μm dan filter 0,1 μm . Nanofiltrasi dapat dilakukan pada tekanan 1 hingga 3 bar. Mikrofiltrasi bertujuan untuk mengurangi kadar polutan dengan cara melewatkannya pada sebuah microporous membran yang berukuran 0.1-1 mikron. Ultrafiltrasi bertujuan untuk menghilangkan kotoran dari zat yang mempunyai berat molekul tinggi, material koloid, serta molekul polimer organik atau anorganik dengan membran berukuran 0,001-0,1 mikron. Teknologi nanofiltrasi mampu mengurangi kesadahan dan menghilangkan mikroba, virus dan prion. Sehingga, pada tahap terakhir ini protein yang dihasilkan adalah protein murni bebas dari senyawa-senyawa kimia lainnya, terutama dari berbagai virus.



Gambar 3.10 Nanofiltrasi

D. Obat Epodion

Setelah melalui berbagai tahap dari *upstream process* hingga *downstream process* atau purifikasi, obat epodion pun akhirnya lulus tahap

uji dan siap untuk bisa diedarkan ke masyarakat. Obat epodion dikatakan lulus uji jika pada proses pengujiannya benar-benar dapat menstimulasi eritrosit untuk bisa menghasilkan darah sesuai dengan standar.

Sehingga, obat epodion yang dihasilkan memiliki berbagai jenis, mulai dari yang 2000 IU, 3000 IU, 4000 IU hingga 10.000 IU. Obat ini biasanya digunakan untuk penderita penyakit gagal ginjal setelah melakukan pencucian darah dan juga penderita kanker yang mengalami anemia. Cara pemakaian obat epodion ini adalah dengan menginjeksi. Obat epodion ini tidak dianjurkan pada pasien yang memiliki tekanan darah tinggi dan penderita gagal hati kronis. Adapun efek samping yang akan ditimbulkan dari pemakaian obat ini diantaranya adalah meningkatnya detak jantung, dapat menimbulkan penyakit asam urat, tekanan darah tinggi, dan sebagainya.



Gambar 3.11 Obat Epodion

BAB IV

PENUTUP

A. Kesimpulan

Kesimpulannya, bahwa purifikasi merupakan langkah yang penting dalam proses pemurnian hormon eritropoietin untuk menghilangkan berbagai virus dan *endotoksin* yang terkandung dalam hormon tersebut. Hormon eritropoietin pada umumnya diproduksi oleh ginjal untuk proses produksi sel darah merah yang baru. Purifikasi dilakukan dalam 7 fase yang terdiri dari kromatografi dan filtrasi. Dalam tiap tahapan, dilakukan pengecekan kadar protein dan kontaminan. Eritropoietin murni yang diperoleh dari proses purifikasi disebut API. Setelah melalui proses purifikasi dan pengecekan, hormon eritrosin inilah akan dapat dijadikan obat epodion yang siap untuk diedarkan kepada masyarakat.

B. Saran

Adapun saran dalam laporan studi ekskursi ini, yaitu diharapkan PT Daewoong Infion dapat memproduksi sebagian bahan baku obat epodion yang berupa CHO sel di Indonesia, agar Indonesia sendiri juga bisa memahami cara mengelola CHO sel. Selain itu, PT Daewoong Infion juga diharapkan dapat lebih mengenalkan produk epodion ke masyarakat melalui berbagai media, seperti periklanan, memanfaatkan relasi dengan rumah sakit, dan lain-lain. Terutama karena produk epodion yang memiliki kualitas

tinggi dengan memperhatikan bahan baku serta proses pengolahan obat yang diuji secara berkala. Dalam proses pengolahan limbah dan sampah plastik yang sudah tidak digunakan, seperti *T-flask bottle* dan *roller bottle*, PT Daewoong sudah memiliki cara penanganan yang tepat, yaitu dengan menyerahkan ke pihak lain yang berfokus pada pengelolaan limbah B3.

CITATION

Nowrousian, Mohammad Resa. (2020). *Recombinant human erythropoietin (rhEPO) in clinical oncology - scientific and clinical aspects of anemia in cancer*. Retrieved 2021, February 16 from

<https://www.springer.com/gp/book/9783211252239>

Yanuartono, Purnamaningsih, H., Nururrozi, Alfarisa., Indarjuliato, S., & Raharjo, S. (2019, June 1). Recombinant human erythropoietin: manfaat dalam bidang kedokteran. *Sain Veteriner Journal*, 37, 49-51. Retrieved 2021, February 16 from

<https://journal.ugm.ac.id/jsv/article/download/48516/25126>

Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, 589(6), 1251-1258. Retrieved 2021, February 16 from

<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1113/jphysiol.2010.195057>

Zhang, et al. (2011). Diafiltration is performed discontinuously (repeated cycles of concentration and dilution) or continuously (at constant volume). *Biotechnology Advances*. Retrieved 2021, February 16 from

<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/diafiltration>

PT Daewoong. (2017). *Visi & misi - daewoong Indonesia*. Retrieved 2021, February 16 from <https://daewoong.co.id/visi-misi/>

PT. Daewoong. (2017). *Sejarah - daewoong Indonesia*. Accessed on 16 February 2021, retrieved from <https://daewoong.co.id/sejarah/>

Wahyuni, S.W. (2016, December 3). *Nanofiltrasi*. Retrieved 2021, February 16 from <https://teklings.wordpress.com/2016/12/03/nanofiltrasi/#:~:text=Nanofiltrasi%20adalah%20proses%20yang%20berhubungan%20dengan%20tekanan,%20ketika,multivalent.%20Membran%20nanofiltrasi%20memiliki%20retensi%20garam%20valensi%20satu.>

Cytiva. (2021). *Fundamentals of mixed mode (multimodal) chromatography*. Retrieved 2021, February 16 from

<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/multimodal-chromatography>

Kedaisains. (2017, May 2). *Kromatografi, jenis-jenis dan cara kerja kromatografi*. Retrieved 2021, February 16 from

<http://kedaisains.blogspot.com/2017/05/cara-kerja->

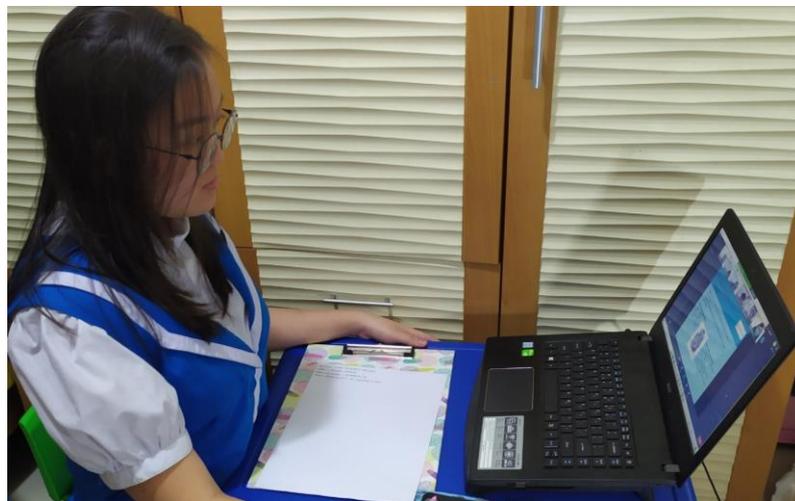
[kromatografi.html#:~:text=Kromatografi%20adsorpsi%20merupakan%20salah%20Osatu,teradsorp%20pada%20permukaan%20fase%20diamnya.](#)

Evitasari, I. (2021, February 8). *Pengertian kromatografi beserta jenis-jenisnya dan secara lengkap*. Retrieved 2021, February 16 from <https://ruangguru.co/pengertian-kromatografi/>

Hage, D. S. (2018). *Adsorption chromatography*. Retrieved 2021, February 16 from <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/adsorption-chromatography>

Lu, H. L., et al. (2012). *Protein adsorption on DEAE ion-exchange resins with different ligand densities and pore sizes*. Retrieved 2021, February 16 from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22707393>

LAMPIRAN



ERYTHROPOIETIN



EPO is a Protein which is a hormone in human body.

Beberapa sebutan EPO:
Erythropoetin
Epoetin
Hematopoietin
Hemopoietin

Human Erythropoetin (hEPO) merupakan suatu protein hormon endogen terglykosilasi dalam tubuh manusia yang berperan dalam stimulasi pembentukan sel darah merah.

