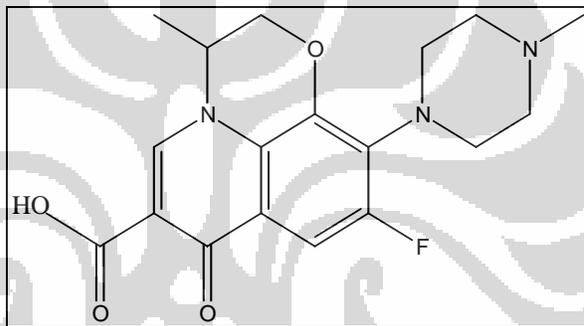


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. LEVOFLOKSASIN

1. Monografi (5, 9, 10)



Gambar 1. Struktur Levofloksasin

Nama kimia : Asam (-)-(S)-9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-okso-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoksasin-6-karboksilat

Rumus molekul : $C_{18}H_{20}FN_3O_4$

Bobot molekul : 361,4

Pemerian : serbuk kristal berwarna putih kekuningan, tidak berbau dan rasanya pahit

Kelarutan : mudah larut dalam asam asetat glasial dan kloroform, sedikit larut dalam air, metanol, etanol atau aseton, sangat sukar larut dalam etil asetat

dan benzen
Titik leleh : 225-227° C
Nama paten : Iquix[®], Levaquin[®], Quixin[™]

2. Sifat Farmakologi

Levofloksasin adalah antibakteri sintetik golongan fluorokuinolon yang merupakan S (-) isomer dari ofloksasin dan memiliki aktivitas antibakteri dua kali lebih besar daripada ofloksasin. Levofloksasin memiliki efek antibakterial dengan spektrum luas, aktif terhadap bakteri gram-positif dan gram-negatif termasuk bakteri anaerob. Levofloksasin telah menunjukkan aktivitas antibakterial terhadap *Chlamydia pneumoniae* dan *Mycoplasma pneumoniae*. Levofloksasin secara *in vitro* lebih aktif melawan bakteri gram-positif, termasuk *Streptococcus pneumoniae* dan bakteri anaerob dibandingkan fluorokuinolon yang lain. Tetapi, levofloksasin kurang aktif melawan *Pseudomonas aeruginosa* dibandingkan dengan siprofloksasin (5, 7, 11).

Mekanisme kerja dari levofloksasin adalah dengan menghambat enzim DNA-*gyrase*, sehingga mengakibatkan kerusakan rantai DNA. DNA-*gyrase* (topoisomerase II) merupakan enzim yang sangat diperlukan oleh bakteri untuk memelihara struktur superheliks DNA, juga diperlukan untuk replikasi, transkripsi dan perbaikan DNA (10).

3. Sifat Farmakokinetika

a. Absorpsi

Levofloksasin mengalami absorpsi yang cepat dan hampir sempurna setelah pemberian secara oral, dimana konsentrasi maksimum dalam plasma dicapai dalam waktu 1 sampai 2 jam. Bioavailabilitas absolut dari tablet levofloksasin 500 mg dan 750 mg adalah sebesar 99% atau lebih besar. Konsumsi levofloksasin bersamaan dengan makanan akan memperpanjang waktu untuk mencapai konsentrasi maksimum hampir 1 jam dan akan mengurangi konsentrasi plasma maksimum hampir 14% (5, 7).

b. Distribusi

Volume distribusi levofloksasin secara umum berkisar antara 74 sampai 112 L setelah pemberian dosis 500 atau 750 mg. Hal ini mengindikasikan bahwa levofloksasin didistribusikan secara luas ke seluruh jaringan tubuh, termasuk jaringan mukosa bronkial dan paru-paru. Levofloksasin berpenetrasi ke dalam jaringan paru-paru dengan baik, dimana konsentrasi dalam jaringan paru-paru biasanya lebih besar 2-5 kali daripada konsentrasi dalam plasma. Ikatan antara levofloksasin dengan protein plasma adalah hampir sebesar 30-40%. Pada manusia, levofloksasin terutama terikat dengan protein albumin (5, 7).

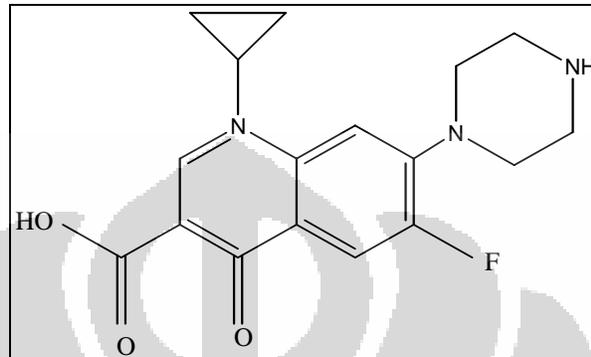
c. Metabolisme

Levofloksasin mengalami metabolisme terbatas dan diekskresikan terutama melalui urin dalam bentuk tidak berubah. Setelah pemberian secara oral, hampir 87% dari dosis yang diberikan, ditemukan dalam bentuk tidak berubah di urin dalam waktu 48 jam, kurang dari 4% ditemukan di feses dalam waktu 72 jam. Dari dosis yang diberikan, kurang dari 5% ditemukan di urin sebagai metabolit desmetil dan N-oksida. Metabolit ini merupakan satu-satunya metabolit yang telah diidentifikasi pada manusia dan memiliki peran yang kecil dalam aktivitas farmakologi (5, 7).

d. Ekskresi

Levofloksasin terutama diekskresikan melalui ginjal dalam bentuk tidak berubah. Waktu paruh eliminasi rata-rata levofloksasin yaitu 6-8 jam setelah pemberian secara oral atau intravena pada individu dengan fungsi ginjal normal. Klirens renal levofloksasin adalah sebesar 96-142 mL/menit. Pemberian levofloksasin bersamaan dengan simetidin atau probenesid akan mengakibatkan klirens renal levofloksasin berkurang sebesar 24% dan 38% (5, 7).

B. SIPROFLOKSASIN (5, 10, 12)



Gambar 2. Struktur Siprofloksasin

Nama kimia : Asam 1-Siklopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-piperazin-1-ilkuinolin-3-karboksilat

Rumus molekul : $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

Bobot molekul : 331,3

Pemerian : serbuk kristal berwarna hampir putih atau kuning muda

Kelarutan : praktis tidak larut dalam air, sangat mudah larut dalam alkohol terdehidrasi dan diklormetan.

Nama paten : Cipro[®], Ciloxan[®]

C. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

1. Teori

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu teknis analisis obat yang paling cepat berkembang. Cara ini ideal untuk analisis beragam obat dalam sediaan cairan biologis karena sederhana dan kepekaannya tinggi. Penggunaannya sangat luas, terdiri dari berbagai metode dalam kromatografi cair. Metode dalam kromatografi cair dapat dibagi menjadi dua macam, yaitu (13):

1. Kromatografi cair retensif

Pemisahan dicapai melalui interaksi antara zat terlarut dengan fase diam. Tipe ini mencakup fase normal, fase terbalik dan kromatografi ion.

2. Kromatografi cair non-retensif

Pemisahan yang dicapai tergantung pada perbedaan besar molekul zat terlarut dimana terjadi interaksi antara zat yang terlarut dengan pori-pori yang terdapat di permukaan fase diam. Tipe ini dikenal sebagai kromatografi eksklusi.

Keuntungan dari penggunaan KCKT antara lain (13, 14):

a. Waktu analisis cepat

Biasanya waktu analisis kurang dari satu jam, banyak analisis yang dapat dilakukan dalam 15-30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit, dapat dicapai waktu analisis yang kurang dari 5 menit.

b. Daya pisahnya baik

Kemampuan pelarut untuk berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak memberikan parameter tambahan untuk mencapai parameter yang dikehendaki.

c. Peka

Kepekaannya sangat tergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.

d. Kolom dapat dipakai kembali

e. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi

f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil

g. Mudah memperoleh kembali cuplikan

Sebagian besar detektor yang dipakai pada KCKT tidak merusak komponen yang dianalisis, sehingga zat yang telah dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor.

h. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

Hal ini sangat bergantung pada detektor yang digunakan. Namun detektor KCKT dapat mendeteksi zat sampai dengan kadar *ppt (part per trillion)*.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam KCKT terdiri dari beberapa bagian, diantaranya adalah pompa, injektor, kolom, detektor dan integrator.

a. Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Pompa harus dibuat dari bahan yang tidak bereaksi terhadap semua macam pelarut. Bahan yang umum digunakan adalah gelas, baja nirkarat, teflon atau batu nilam. Pompa, segel-segel pompa dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak (13). Jenis-jenis pompa antara lain: *reciprocating pump*, *syringe pump* dan *pneumatic pump*.

b. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Jenis injektor yang dapat digunakan antara lain injektor aliran henti, septum, katup jalan kitar dan autoinjektor (13).

c. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Untuk menahan tekanan yang tinggi, kolom dibuat dari bahan yang kokoh seperti *stainless steel* atau campuran logam dengan gelas (13). Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT, karena ikut menentukan keberhasilan dalam analisis. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu (14):

1) Kolom analitik

Panjang kolom berkisar antara 10-30 cm, diameter dalam 4-10 mm, ukuran partikel umumnya 3, 5 dan 10 μm .

2) Kolom preparatif

Kolom preparatif umumnya memiliki diameter dalam 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom sekitar 25-100 cm.

d. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada di dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Idealnya, suatu detektor yang baik harus mempunyai kepekaan yang tinggi, hasilnya dapat diulang, responnya dapat diramalkan, tidak terpengaruh oleh perubahan suhu atau komposisi eluen, dapat dipercaya serta mudah dioperasikan.

Jenis detektor yang umum digunakan pada KCKT adalah (13):

1) Detektor serapan optik

Detektor ini bekerja berdasarkan absorpsi ultraviolet-visibel dan digunakan untuk mendeteksi komponen zat yang menyerap cahaya di daerah ultraviolet (190-400nm), cahaya tampak (400-700 nm) dan infra merah (2-25 μm). Keuntungan dari detektor ini adalah pemilihan panjang gelombang yang luas dan sensitivitas terhadap analit yang baik.

2) Detektor indeks bias (RID)

Detektor ini memberikan respon akibat perubahan indeks bias yang disebabkan cuplikan. Sensitivitas deteksi, yang umumnya mencapai mikrogram, sangat rendah bila dibandingkan dengan detektor lain. Detektor ini sangat peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir.

3) Detektor fluoresensi

Sifat dari senyawa kimia yang dapat menyerap cahaya dan kemudian

memancarkannya pada panjang gelombang yang lebih tinggi disebut sebagai fluoresensi. Kepekaan dan selektivitas detektor ini cukup tinggi karena hanya komponen zat yang dapat berfluoresensi saja yang dapat terdeteksi. Detektor fluoresensi banyak digunakan dalam analisis farmasi dan cairan biologis karena 100 kali lebih peka daripada detektor ultraviolet-visibel. Deteksi minimum untuk detektor fluoresensi dapat mencapai tingkat pikogram (10^{-12} g).

4) Detektor elektrokimia (ECD)

Detektor ini digunakan untuk mendeteksi senyawa yang dapat mengalami reaksi oksidasi dan reduksi. Pendeteksian tergantung pada sifat hantaran molekul zat terlarut. Deteksi dimungkinkan apabila terjadi transfer elektron secara reversibel oleh suatu zat melalui gugus fungsional tertentu.

5) Detektor ionisasi nyala (FID)

Pada detektor ini, pelarut diuapkan setelah melewati kolom kemudian dilewatkan pada sumber lampu ultraviolet dan dideteksi nyala. Kelemahan detektor ini terletak pada batas deteksinya yang hanya sekitar 1 μ g.

6) Detektor radioaktif

Selektivitas detektor ini tinggi karena hanya zat yang memancarkan radiasi saja yang dideteksi. Detektor ini mempunyai kemampuan besar untuk kajian nasib obat dan penimbunan senyawa berlabel pada hewan percobaan.

e. Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Ada dua macam

integrator, yaitu (13):

- 1) Integrator piringan yang bekerja secara mekanik
- 2) Integrator digital atau elektronik, dapat memberikan ketelitian yang tinggi dan waktu integrasi yang singkat.

3. Fase Gerak

Pada kromatografi cair, variasi pada fase gerak merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pemisahan. Pemilihan fase gerak berdasarkan pada kesesuaian dengan mekanisme pemisahan, kemampuannya untuk melarutkan cuplikan, dan kepolarannya yang dapat diubah dengan merubah komposisi fase gerak. Senyawa yang akan dipisahkan harus larut dalam pelarut yang digunakan. Pelarut ini tidak perlu tepat sama dengan eluen yang digunakan, akan tetapi pelarut tersebut harus dapat larut di dalam eluen (14).

Fase gerak yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut (13):

- a. Murni
- b. Tidak bereaksi dengan kolom
- c. Sesuai dengan detektor
- d. Selektif terhadap komponen
- e. Dapat melarutkan cuplikan
- f. Mempunyai viskositas yang rendah
- g. Memungkinkan memperoleh kembali cuplikan dengan mudah
- h. Harganya wajar
- i. Dapat memisahkan zat dengan baik

Secara umum fase gerak dibagi menjadi dua, yaitu:

1) Fase gerak fase terbalik

Kandungan utama fase gerak fase terbalik adalah air. Pelarut yang dapat bercampur dengan air, seperti metanol, etanol dan asetonitril dapat ditambahkan untuk mengatur kepolaran fase gerak, selain itu dapat pula ditambahkan asam, basa dan dapar.

2) Fase gerak fase normal

Fase gerak ini biasanya non polar, yang sering digunakan sebagai fase gerak fase normal adalah hidrokarbon alifatis seperti pentana, heksana, heptana dan iso-oktana. Selain itu, golongan halida alifatis seperti diklormetan, dikloretena, butil klorida, dan kloroform juga digunakan.

4. Analisis

Analisis KCKT dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif.

a. Analisis kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan dengan memperhatikan waktu retensi. Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama.

b. Analisis kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu (14):

1) Baku dalam

Cara ini mencakup penambahan senyawa baku yang jumlahnya diketahui, kemudian campuran itu dibuat untuk disuntikkan ke alat kromatografi, lalu dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Setelah itu dibuat kurva antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminasi, tetapi kesulitannya adalah diperlukan baku dalam yang tepat.

Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh senyawa yang digunakan sebagai baku dalam, yaitu:

- a. Harus terpisah sama sekali dari puncak cuplikan
- b. Harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur
- c. Konsentrasi dan tanggapan detektornya harus sama dengan konsentrasi dan tanggapan detektor puncak yang diukur
- d. Tidak boleh bereaksi dengan komponen cuplikan
- e. Tidak terdapat dalam cuplikan asal
- f. Harus sangat murni dan mudah didapat

2) Baku luar

Cara ini digunakan untuk analisis pada konsentrasi yang sangat rendah dimana larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kemudian dibuat kurva kalibrasi antara luas puncak

terhadap konsentrasi. Lalu larutan sampel yang akan dianalisis disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan cara ini adalah diperlukan baku murni serta diperlukan ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan karena harus menyuntikkan volume yang tepat sama.

D. FLUOROMETRI

Pada fluorometri, pengukuran dilakukan pada cahaya yang diemisikan, bukan yang ditransmisikan. Oleh karena itu, sensitivitas metode fluoresensi lebih baik dibandingkan dengan metode absorpsi dimana batas *noise*-nya lebih rendah.

Fluoresensi suatu molekul dikarakterisasi oleh 2 aspek spektrum yaitu spektrum eksitasi dan spektrum emisi. Untuk menghasilkan spektrum emisi, pencarian panjang gelombang emisi dilakukan pada panjang gelombang eksitasi maksimum.

Prasyarat untuk fluoresensi adalah adanya suatu sistem yang mengabsorpsi, walaupun tidak semua sistem yang seperti ini berfluoresensi. Hubungan antara struktur dan fluoresensi sudah diteliti dan ramalan terbatas yang mencakup kromofor, aoksokrom dan fluoresensi dapat dibuat. Jadi senyawa aromatik yang mengandung gugus hidroksil, metoksil, amino dan alkil amino mampu berfluoresensi, sedangkan senyawa yang mengandung

gugus asetilamino, karboksil, halogen dan gugus nitro cenderung tidak berfluoresensi (15).

Faktor-faktor yang mempengaruhi fluoresensi antara lain (16):

1. Absorpsi

Sensitivitas ekstrim metode membutuhkan larutan yang sangat encer, 10-100 kali lebih encer daripada larutan yang digunakan pada spektrofotometri. Adsorpsi senyawa yang berfluoresensi pada dinding wadah dapat memberikan masalah yang cukup serius, sehingga harus dibuat larutan stok yang pekat untuk kemudian diencerkan sesuai dengan yang dikehendaki.

2. Cahaya

Harus digunakan cahaya monokromatik untuk eksitasi fluoresensi pada analisis kuantitatif.

3. Oksigen

Adanya gas oksigen akan memperkecil intensitas fluoresensi. Hal ini disebabkan karena terjadinya oksidasi senyawa akibat pengaruh cahaya (*fotokemikali induksi oksidasi*). Pengurangan intensitas fluoresensi disebut pemadaman sendiri atau *quenching*.

4. pH

pH berpengaruh pada letak keseimbangan antara bentuk terionisasi dan bentuk tak terionisasi. Sifat fluoresensi dari kedua bentuk itu berbeda. Sebagai contoh, fenol dalam suasana asam akan berada dalam bentuk molekul utuh dengan panjang gelombang antara 285-365 nm, sementara itu

dalam suasana basa, fenol akan terionisasi membentuk ion fenolat yang mempunyai panjang gelombang antara 310-400 nm.

5. Suhu dan viskositas

Variasi dalam suhu dan viskositas dapat menyebabkan variasi dalam frekuensi tumbukan antara molekul-molekul. Bertambahnya suhu atau berkurangnya viskositas akan mengurangi fluoresensi. Hal ini disebabkan pada suhu yang lebih tinggi, tabrakan-tabrakan antar molekul atau dengan molekul pelarut menjadi lebih sering; yang mana pada peristiwa tabrakan, kelebihan energi molekul yang tereksitasi akan dilepaskan ke molekul pelarut.

Penentuan intensitas fluoresensi dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain (15):

1. Pengukuran langsung

Senyawa yang memang berfluoresensi secara intrinsik dapat langsung ditentukan dengan mengukur intensitas fluoresensinya.

2. Fluoresensi yang diinduksi secara kimia

Senyawa yang tidak berfluoresensi diubah menjadi turunannya yang berfluoresensi dengan mereaksikan secara kimia dengan bahan pengkompleks.

3. Fluoresensi yang diinduksi oleh penyinaran

Transformasi kimia juga dapat diperoleh dengan penggunaan cahaya

ultraviolet gelombang pendek yang kuat. Tetapi sifat senyawa berfluoresensi yang terbentuk sering tidak menentu.

4. Pengkopelan dengan reaksi fluoresensi

Pembentukan suatu senyawa turunan berfluoresensi dengan pereaksi fluoresensi seperti fluoreksamin, o-ftalaldehid, DBD-klorida, dan lain-lain.

Ada tiga keuntungan analisis fluorometri dibandingkan dengan spektrofotometri absorpsi yaitu (16):

1. Fluorometri lebih peka

Pada fluorometri, pengukuran dilakukan secara langsung terhadap intensitas sinar fluoresen. Pengukuran langsung ini tanpa dilakukan perbandingan terhadap intensitas sinar semula (I_0). Hal ini dapat tercapai karena detektor pada fluorometri ditempatkan pada arah yang tegak lurus terhadap sinar pengekstasi.

2. Fluorometri lebih selektif

Hal ini karena hanya sedikit senyawa yang dapat memancarkan kembali sinar fluoresen. Sementara itu, pada proses absorpsi dapat dikatakan bahwa hampir semua senyawa organik mampu melakukannya.

3. Fluorometri dapat mengurangi gangguan spektral

Pada fluorometri gangguan spektral dapat dikurangi dengan cara merubah panjang gelombang eksitasi atau emisi. Gangguan spektral adalah gangguan yang ditimbulkan oleh senyawa-senyawa lain yang melakukan

penyerapan (absorpsi) dan emisi sinar fluoresen pada panjang gelombang yang sama dengan senyawa yang dianalisis.

E. ANALISIS OBAT DALAM PLASMA

Darah merupakan substansi yang kompleks, berbentuk cairan berwarna merah, agak kental dan lengket. Darah mengalir di seluruh tubuh kita dan berhubungan langsung dengan sel-sel di dalam tubuh. Darah terdiri dari beberapa komponen, yaitu plasma darah, sel darah merah, sel darah putih dan keping darah. Plasma darah merupakan komponen terbesar dalam darah, karena lebih dari separuh jumlah darah mengandung plasma darah. Plasma darah berupa cairan bening kekuningan yang terdiri dari 90% air, merupakan bahan terpenting dalam kelangsungan hidup manusia. Selain air, plasma darah juga mengandung garam dan mineral-mineral seperti kalsium, natrium dan kalium (17).

Plasma harus ditambahkan antikoagulan terlebih dahulu agar dapat dipisahkan dari darah dengan cara sentrifugasi, namun harus dilakukan dengan hati-hati karena sel darah merah mudah pecah yang dapat mengakibatkan pemisahan plasma menjadi lebih sulit. Sel darah merah dapat pecah karena beberapa perlakuan seperti pemanasan, pembekuan, penggunaan alat-alat mekanik seperti pengocokan dengan *stirrer*, tetapi penyebab yang paling umum adalah karena penambahan air atau alkohol yang menyebabkan fenomena osmosis karena sel mengembang dan akhirnya hancur. Oleh karena itu, umumnya ekstraksi tidak dilakukan

terhadap sampel darah, melainkan terhadap plasma yang telah disiapkan terlebih dahulu (18).

Konsentrasi obat dalam plasma umumnya rendah pada dosis terapi, oleh karena itu diperlukan persiapan sampel khusus untuk analisis obat dalam plasma. Dalam plasma, obat terikat pada permukaan protein sehingga obat harus dibebaskan terlebih dahulu. Beberapa cara yang bisa dilakukan untuk mencapai tujuan di atas diantaranya ialah dengan:

1. Pengendapan protein

Pada pengendapan protein, biasanya digunakan asam atau pelarut organik yang dapat bercampur dengan air untuk memisahkan protein dari plasma. Asam trikloroasetat dan asam perklorat sangat efisien sebagai pengendap protein, tetapi asam yang terlalu kuat dapat menimbulkan efek kerusakan terhadap obat yang diekstraksi. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton dan etanol, meskipun memiliki efisiensi yang relatif rendah dalam hal memisahkan protein, tetapi pelarut ini telah digunakan secara luas dalam bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT.

Setelah dicampur (biasanya menggunakan bantuan *vortex*), sampel disentrifugasi untuk menghasilkan supernatan yang jernih, berisi komponen yang diinginkan. Larutan yang telah bebas protein mungkin perlu diekstraksi lebih lanjut dengan teknik ekstraksi cair-cair dengan pelarut organik yang tidak bercampur, atau dapat langsung disuntikkan pada sistem analisis yang akan digunakan, bila diyakini obat sepenuhnya larut dalam supernatan (19).

2. Ultrafiltrasi

Larutan bebas protein dapat diperoleh melalui proses penyaringan dengan melewatkan larutan pada suatu membran semipermeabel yang selektif dengan menggunakan tekanan dalam membran yang berbentuk kerucut. Dalam hal ini digunakan tekanan hidrostatis (1-10 atm) untuk memberikan dorongan dalam proses pemisahan. Membran ultrafiltrasi mempunyai struktur *microporous* dan semua molekul yang ukurannya lebih besar dari diameter terbesar pori-pori membran akan tertahan, sedangkan molekul yang ukurannya lebih kecil dari diameter terkecil pori-pori akan dapat menembus membran (1).

3. Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair adalah proses pemindahan suatu komponen dari satu fase cair ke fase cair lainnya yang tidak saling bercampur sesamanya. Prosesnya disebut partisi atau distribusi. Jika suatu zat yang terlarut terdistribusi antara dua cairan atau pelarut yang tidak saling bercampur, maka dalam sistem akan terjadi kesetimbangan:

Zat terlarut dalam fase bawah \leftrightarrow Zat terlarut dalam fase atas

Umumnya, salah satu fasenya berupa air atau larutan air. Cara paling umum yang sering digunakan untuk pemisahan parsial adalah metode ekstraksi dengan pelarut organik. Agar obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik, maka obat itu harus dalam bentuk tidak terionisasi. Oleh karena

itu, pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi ini dengan sempurna. Optimasi dapat dilakukan dengan menghitung atau menentukan pKa obat. Selain itu, sifat dari pelarut organik juga memegang peranan penting. Senyawa yang sangat lipofil akan dengan sangat mudah terekstraksi oleh pelarut organik non polar, sedangkan senyawa hidrofil lebih mudah larut dalam pelarut yang relatif polar. Dalam proses ekstraksi perlu juga diperhatikan densitas pelarut. Jika hendak menggunakan corong pisah, pelarut pengestraksi hendaknya lebih berat dari air. Jika ekstraksi hendak dilakukan dengan tabung sentrifus, sebaiknya pelarut pengestraksi lebih ringan dari air.

Untuk pemisahan obat dalam cairan atau matriks biologis secara ekstraksi cair-cair jarang digunakan corong pisah, karena volume sampel umumnya adalah kecil. Umumnya pemisahan dilakukan dengan tabung sentrifus. Untuk mempercepat pemisahan, sebelumnya campuran disentrifus terlebih dahulu.

Setelah dipisahkan dari fase air, fase organik harus benar-benar bebas air. Untuk mempercepat penguapan, dapat ditambahkan beberapa tetes etanol, dan air dapat dihilangkan dari fase organik dengan penambahan sedikit natrium sulfat anhidrat pada saat penyaringan. Penguapan dapat dilakukan dengan alat evaporator vakum atau diuapkan pada temperatur kamar (18).

4. Ekstraksi fase padat (SPE)

Ekstraksi fase padat adalah suatu teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. Pada ekstraksi fase padat, analit ditahan oleh fase padat saat sampel dilewatkan, kemudian dilanjutkan dengan elusi analit oleh pelarut yang sesuai. Pada teknik ini digunakan kolom berukuran kecil dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis. Metode ekstraksi fase padat ini berdasarkan prinsip dari kromatografi, yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam (19).

Pemilihan cara isolasi obat dalam plasma harus dilakukan karena akan memberikan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang maksimum dari obat yang dianalisis. Selain itu juga, untuk memperbaiki ketelitian, maka penggunaan baku dalam dapat ditambahkan pada sampel.

F. VALIDASI METODE BIOANALISIS (20)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (21). Tiga tipe dari validasi adalah validasi penuh, validasi parsial dan validasi silang. Validasi penuh penting dilakukan saat mengembangkan dan mengimplementasikan metode bioanalisis untuk pertama kali. Sementara itu, validasi parsial adalah modifikasi dari metode bioanalisis yang telah

divalidasi. Validasi silang adalah perbandingan dari parameter validasi saat digunakan dua atau lebih metode bioanalisis untuk mengolah data dalam studi yang sama atau studi silang yang berbeda. Parameter-parameter dalam validasi metode bioanalisis meliputi akurasi, presisi, selektivitas, linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, kurva kalibrasi dan stabilitas.

1. Akurasi (Kecermatan)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Uji akurasi dilakukan melalui analisis replikasi dari sampel yang mengandung analit dengan jumlah yang diketahui. Syarat akurasi yang baik untuk sampel biologis adalah nilai rata-ratanya tidak menyimpang dari -15% dan +15%.

2. Presisi (Keseksamaan)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur melalui lima kali penetapan untuk tiap konsentrasi yang berbeda. Syarat presisi yang baik adalah nilai koefisien variasi pada setiap konsentrasi tidak lebih dari 15%.

3. Selektivitas (Spesifisitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan metode tersebut yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Untuk selektivitas, analisis sampel dilakukan pada matriks biologis yang

berasal dari enam sumber yang berbeda. Selektivitas diukur pada konsentrasi LLOQ.

4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima. Syarat kelinearan garis adalah nilai koefisien korelasi (r) lebih besar dari atau sama dengan 0,9990. Koefisien fungsi regresi untuk sampel biologis kurang dari atau sama dengan 5%.

5. Batas Deteksi (*Limit of Detection / LOD*)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon yang signifikan bila dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas.

6. Batas Kuantitasi (*Limit of Quantitation / LOQ*)

Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

7. Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi menunjukkan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi disiapkan dalam matriks biologis yang sama sebagai sampel, dengan menambahkan suatu

analit yang konsentrasinya telah diketahui ke dalam matriks. Kurva kalibrasi terdiri dari sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), sampel *zero* (matriks dengan baku dalam), dan enam sampai delapan sampel yang mencakup *range* pengukuran (termasuk LLOQ). Respon analit pada LLOQ harus lima kali lebih besar dibandingkan dengan respon blanko, dapat diidentifikasi, diskret, reproduisibel, dengan presisi 20% dan akurasi 80-120%.

8. Stabilitas

Stabilitas obat dalam matriks biologis dapat ditentukan dan bergantung pada kondisi penyimpanan, sifat kimia obat, matriks dan wadah penyimpanan. Stabilitas analit dalam matriks dan wadah penyimpanan tertentu tidak dapat diekstrapolasikan dengan matriks dan wadah penyimpanan yang lain. Stabilitas analit dievaluasi mulai dari proses pengambilan sampel dan penanganannya, tempat dan kondisi penyimpanan sampai proses analisisnya. Beberapa jenis uji stabilitas untuk validasi metode bioanalisis yaitu stabilitas *freeze-thaw*, stabilitas jangka pendek, stabilitas jangka panjang, stabilitas larutan stok dan stabilitas *post-preparative*.

G. METODE ANALISIS LEVOFLOKSASIN

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis levofloksasin dalam matriks biologis yang telah dipublikasikan, yaitu:

1. Penetapan kadar levofloksasin dengan metode KCKT isokratik fase terbalik.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dan kolom Spherisorb[®] 5 ODS (25 x 4,6 mm) dengan panjang gelombang eksitasi 310 nm dan emisi 467 nm. Fase gerak yang digunakan adalah asam ortofosfat 0,16% dan tetrabutylammonium hidroksida (pH 3)-asetonitril (95:5 v/v) dengan laju alir 1,5 mL/menit dan temperatur kolom 50° C. Kurva kalibrasi linear pada konsentrasi 0-8 µg/mL. Nilai LOD adalah sebesar 0,05 µg/mL (22).

2. Metode KCKT cepat dan sederhana untuk penetapan levofloksasin dalam plasma manusia dan penggunaannya dalam studi bioekivalensi.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 294 nm dan kolom Kromasil[®] C₁₈. Fase gerak yang digunakan adalah campuran asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (14:86:0,6:0,3 v/v/v/v) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Siprofloksasin digunakan sebagai baku dalam. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 0,05-5,0 µg/mL ($r > 0,99$) (8).

3. Farmakokinetik levofloksasin dosis tunggal selama haemofiltrasi veno-venous.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dan kolom RP-18 (125 x 3 mm) dengan panjang gelombang eksitasi 277 nm dan emisi 445 nm. Fase gerak yang digunakan adalah dietanolamin 0,5% atau

dapar asetat (pH 3,5) dan metanol (80:20 v/v) dengan laju alir 1 mL/menit. Nilai LLOQ yang diperoleh adalah sebesar 0,05 µg/mL (23).

4. Studi farmakokinetik dari dua formulasi oral levofloksasin pada sukarelawan pria dewasa sehat.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 293 nm dan kolom Kromasil[®] C₁₈ (4,6 x 250 mm; ukuran partikel 5 µm). Fase gerak yang digunakan adalah asam sitrat 0,05 M-ammonium asetat 1 M-asetonitril (77:1:22 v/v/v) dengan laju alir 1 mL/menit. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 25-1000 ng/mL (6).

5. Farmakokinetik dan farmakodinamik dari levofloksasin intravena dosis 750 mg dan berbagai dosis metronidazol pada subjek dewasa sehat.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dan kolom C₁₈ (3,9 x 150 mm; ukuran partikel 5 µm) dengan panjang gelombang eksitasi 280 nm dan emisi 389 nm. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril-air (42:58 v/v) dengan laju alir 1,5 mL/menit dan temperatur kolom 30° C. Kurva kalibrasi levofloksasin linear pada rentang konsentrasi 0,092-18 µg/mL (24).

6. Metode KCKT cepat dan sederhana untuk penetapan konsentrasi levofloksasin dalam plasma manusia dan aplikasinya terhadap studi bioekivalensi.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dan kolom C₁₈ dengan panjang gelombang eksitasi 295 nm dan emisi 440 nm. Levofloksasin dan terazosin (baku dalam) diekstraksi dari plasma manusia dengan menggunakan diklormetan. Fase gerak yang digunakan adalah dapar fosfat 10 mM (pH 3,0)-asetonitril-trietilamin (76:24:0,076 v/v/v) dengan laju alir 1 mL/menit. Kurva kalibrasi linear pada konsentrasi 0,0521-5,213 µg/mL (25).

7. Farmakokinetik dari moksifloksasin dan levofloksasin pada pasien UGD dengan gagal ginjal akut.

Kondisi :

Metode analisis dengan menggunakan KCKT detektor fluoresensi dan kolom C₁₈ (4,6 x 150 mm; ukuran partikel 5 µm) dengan panjang gelombang eksitasi 295 nm dan emisi 490 nm. Fase gerak yang digunakan adalah air-metanol-trietilamin-asam ortofosfat (750:250:4:2,5 v/v/v/v) dengan laju alir 1,5 mL/menit. Siprofloksasin digunakan sebagai baku dalam. Kurva kalibrasi levofloksasin linear pada konsentrasi 0,1-40 µg/mL (26).

8. Kromatografi cair interaksi hidrofilik-spektrometri massa tandem untuk penetapan levofloksasin dalam plasma manusia.

Kondisi :

Metode analisis dengan kromatografi cair interaksi hidrofilik-spektrometri massa tandem (*Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass*

Spectrometric/ HILIC-MS/MS) dan menggunakan kolom silika Atlantis. Levofloksasin dan siprofloksasin (baku dalam) diekstraksi dari plasma manusia dengan diklormetan, kemudian dianalisis dengan menggunakan fase gerak asetonitril-ammonium format 100 mM pH 6,5 (82:18 v/v). Kurva kalibrasi linear ($r > 0,999$) pada rentang konsentrasi 10,0-5000 ng/mL. Nilai LLOQ yang diperoleh untuk levofloksasin adalah sebesar 10,0 ng/mL dengan menggunakan 20 μ L plasma (27).

9. Validasi penetapan kadar levofloksasin dalam plasma dan dialisat secara KCKT untuk studi farmakokinetik.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dan kolom YMC Pro C18 RP (150 x 2 mm) dengan panjang gelombang eksitasi 294 nm dan emisi 500 nm. Preparasi sampel dilakukan dengan pengendapan protein untuk plasma atau injeksi langsung untuk larutan dialisat. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 0,1-6 μ g/mL untuk plasma dan 0,1-5 μ g/mL untuk dialisat dengan presisi *intra-* dan *inter-day* serta akurasi di bawah 10% (28).

10. Penetapan zidovudin dan levofloksasin dalam plasma manusia secara KCKT fase terbalik dan ekstraksi fase padat.

Kondisi :

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 266 nm. Preparasi sampel plasma dilakukan dengan prosedur ekstraksi fase-padat (SPE). Fase gerak yang digunakan adalah natrium

fosfat monobasa 25 mM dan asam trifluoroasetat 0,1% (pH 2,4)-asetonitril (86:14 v/v). Siprofloksasin digunakan sebagai baku dalam. Metode ini telah divalidasi pada rentang konsentrasi 26,3-2600 ng/mL untuk zidovudin dan 51,2-5069 ng/mL untuk levofloksasin (29).

