

Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam *Spiked*-plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor UV untuk Aplikasi Pemantauan Kadar Obat dalam Darah

Ari Wibowo, Damas Inggil Maulidina, Wahyuni Shalatan Fitri, Vitarani Dwi Ananda Ningrum*

Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Islam Indonesia

*email : vitarani.ningrum@uii.ac.id

Abstract

As the first-line antibiotic for the treatment of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin has a narrow therapeutic index with high pharmacokinetic variability. Therefore, it is deemed necessary to examine its concentration in the blood as a strategy to monitor the fulfillment of therapeutic levels in patients receiving vancomycin. This study aimed to validate vancomycin bioanalysis in spiked-human plasma for the applications of therapeutic drug monitoring (TDM). Spiked samples were analyzed using Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with octadecylsilane columns, a mixture of pH 3 phosphate buffer and methanol (80:20 v/v) as the mobile phase read at λ 213 nm. The linearity of calibration curve for vancomycin in spiked-human plasma was tested in the range of 0-60 $\mu\text{g/mL}$ resulting in 0.9998 correlation coefficient and 3 $\mu\text{g/mL}$ Lower Limit of Quantification (LLOQ). The coefficient of variation and %diff in the selectivity, accuracy, and precision parameters have met the criteria of bioanalysis method, reaching less than 20%. In addition, vancomycin in plasma was stable for 21 days at a storage temperature of -20°C and for 24 hours at the ambient temperature (25°C). Such validated bioanalysis method can be used to determine the concentration of vancomycin in human plasma as an application of TDM in the clinical setting for the approach to adjusting an effective vancomycin dose, particularly in elderly patients or those with reduced renal function.

Keywords: Vancomycin, Plasma, Method Validation, HPLC-UV Detector, Applications of TDM

Abstrak

Sebagai antibiotika lini pertama penanganan infeksi yang disebabkan oleh *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisin memiliki indeks terapeutik sempit dengan variabilitas farmakokinetika yang tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemeriksaan kadarnya dalam darah sebagai upaya pemantauan ketercapaian kadar terapeutik pada pasien yang mendapatkan vankomisin. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi bioanalisis vankomisin dalam *spiked*-plasma manusia untuk aplikasi pemantauan kadar obat dalam darah (PKOD). *Spiked*-sampel dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan kolom octadecylsilane, fase gerak campuran dapar fosfat pH 3 dan metanol (80:20 v/v), dan dibaca pada λ 213 nm. Hasil uji linearitas kurva kalibrasi vankomisin *spiked*-plasma pada rentang 0-60 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan nilai koefisien korelasi 0,9998 dengan Lower Limit of

Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam *Spiked*-plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor UV ...

Quantification (LLOQ) yakni 3 µg/mL. Nilai koefisien variasi dan % diff pada parameter selektivitas, akurasi, dan presisi telah memenuhi kriteria metode bioanalisis, yaitu kurang dari 20%. Selain itu, vankomisin dalam plasma stabil selama 21 hari pada suhu penyimpanan -20°C dan 24 jam pada suhu kamar (25°C). Metode bioanalisis yang tervalidasi ini dapat digunakan untuk menentukan kadar vankomisin dalam plasma manusia sebagai aplikasi pemantauan kadar obat dalam darah (PKOD) pada ranah klinis untuk pendekatan penyesuaian dosis efektif vankomisin, terutama pada pasien lanjut usia atau dengan penurunan fungsi ginjal.

Kata kunci : Vankomisin, Plasma, Validasi Metode, KCKT detektor UV, Aplikasi PKOD

Pendahuluan

Vankomisin merupakan salah satu terapi antibiotika lini pertama yang diindikasikan secara luas pada infeksi bakteri gram positif multi-resisten invasif, terutama pada *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) di banyak negara (Khudaibergenova, 2015; Usman dan Hempel, 2016). Jika dibandingkan antibiotika lainnya, vankomisin memiliki indeks terapeutik sempit dengan tingkat variabilitas farmakokinetika tinggi. Selain itu, interaksinya dengan obat lain berpotensi menyebabkan peningkatan maupun penurunan kadar vankomisin dalam plasma sehingga memengaruhi efektivitas maupun kemungkinan kejadian toksik yang berupa nefrotoksik dan ototoksik (Bauer, 2008; Anonim, 2012). Oleh karena itu, Pemantauan Kadar Obat dalam Darah (PKOD) terapi vankomisin diperlukan untuk memastikan kecukupan kadar terapeutik serta keamanannya yang merupakan

pendekatan terbaik untuk memperoleh profil farmakokinetika obat tersebut dalam tubuh (Shargel dkk., 2012).

Beberapa metode penetapan kadar vankomisin dalam plasma manusia menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor UV (Farin dkk., 1998; Hagihara dkk., 2013; Johnson dan Yalkowsky, 2006; Li dkk., 1995; Usman dan Hempel, 2016), fluoresensi (Abu-Shandi, 2009), dan spektrometri masa (Oyaert dkk., 2015; Zhang, 2014) telah tersedia. Namun ada kekurangannya antara lain dalam preparasi sampel plasma membutuhkan kolom *Solid Phase Extraction* (SPE), menggunakan teknik elusi gradien yang mendorong kinerja pompa instrumen KCKT, menggunakan detektor fluorometer dan spektrum massa yang tidak tersedia di sebagian besar laboratorium, serta kebutuhan volume sampel plasma yang relatif banyak (0,5 mL). Hal ini dinilai kurang efisien karena menggunakan peralatan yang relatif canggih, bahan yang relatif mahal

untuk dikembangkan sebagai aplikasi PKOD di ranah klinis. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode bioanalisis vankomisin dengan menggunakan KCKT-UV sebagai langkah awal penyediaan metode yang *reliable* dan *reproducible* yang berpotensi diterapkan pada ranah klinis dengan biaya yang lebih terjangkau.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain standar vankomisin (grade BPFI, BPOM), plasma darah (PMI Kab. Sleman), asetonitril (pro LC, J.T. Baker), akuabidestilata (Ikapharmindo Putramas, Indonesia), kalium dihidrogen fosfat (pro analisis, Merck), asam ortofosfat (pro analisis, Merck), metanol (pro LC, J.T. Baker), diklorometan (pro analisis, Merck), dan asam klorida (pro analisis, Merck).

Penentuan kadar vankomisin dalam plasma menggunakan instrumen KCKT-UV (waters Alliance e2695) fase terbalik dengan kolom C₁₈ (Xterra® 250x4,6 mm, 5 µm). Pembacaan standar dan sampel menggunakan fase gerak campuran 5 mM dapar fosfat pH 3 dan metanol (80:20 v/v) pada suhu kamar,

panjang gelombang 213 nm dengan volume injeksi 20 µL.

Prosedur

Penyiapan Sampel plasma

Plasma manusia diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI) Kabupaten Sleman, yang berasal dari pendonor sehat yang telah mengisi formulir dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Kurva Baku *spiked*-plasma Vankomisin dan Linieritas Metode Analisis

Dibuat larutan stok vankomisin 1000 µg/mL untuk membuat larutan stok kerja vankomisin 100 µg/mL menggunakan pelarut fase gerak. Dipipet sejumlah larutan stok kerja lalu ditambahkan plasma hingga mencapai volume akhir 200 mikroliter untuk membuat seri kadar *spiked*-plasma vankomisin pada konsentrasi 0, 3, 10, 20, 30, 50, dan 60 µg/mL. Nilai linearitas ditentukan dengan menggunakan *least square method* dari kurva baku tersebut.

Selektivitas, Akurasi, dan Presisi Metode Analisis

Sebanyak 6 larutan *spiked*-plasma vankomisin pada konsentrasi 3 µg/mL yang berasal dari individu yang berbeda disiapkan untuk pengujian selektivitas

Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Spiked-plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor UV ...

metode. Disiapkan pula 4 larutan sampel *spiked*-plasma pada konsentrasi 3,0; 15,0; 31,5; 48,0 µg/mL sebagai konsentrasi LLoQ (*Lower Limit of Quantification*), QCL (*Quality Control-Low*), QCM (*Quality Control-Medium*), dan QCH (*Quality Control-High*). Dilakukan pengujian akurasi dan presisi metode sebanyak 5 kali replikasi pada keempat konsentrasi tersebut selama 3 hari.

Stabilitas

Disiapkan 2 larutan sampel *spiked*-plasma pada konsentrasi QCL dan QCH untuk uji stabilitas jangka pendek, jangka panjang, siklus beku-cair, dan paska preparasi vankomisin. Pada uji stabilitas jangka pendek, sampel disimpan pada suhu kamar (25°C), kemudian pengujian dilakukan pada jam ke- 0, 6, dan 24 dengan dibuat sebanyak 3 replikasi untuk masing-masing konsentrasi. Sementara itu, untuk uji stabilitas jangka panjang, sampel disimpan pada suhu -20°C dan pengujian dilakukan pada hari ke- 0, 7, 14, dan 21. Seperti halnya pada uji stabilitas jangka pendek, pada pengujian ini juga dibuat sebanyak 3 replikasi untuk masing-masing konsentrasi. Sedangkan pada uji stabilitas beku-cair dilakukan dengan menyimpan sampel pada suhu -20°C selama 24 jam

selanjutnya dibiarkan mencair pada suhu kamar (25°C) untuk memperoleh 1 siklus. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali siklus beku-cair dengan pengujian dilakukan pada siklus ke- 0, dan 3 pada masing-masing konsentrasi dengan 3 kali replikasi. Untuk uji stabilitas paska preparasi dilakukan dengan menyimpan sampel yang telah diekstraksi dalam wadah *autosampler* pada suhu kamar (25°C) selama 24 jam. Pengujian dilakukan pada jam ke- 0, 6, dan 24 paska penyiapan sampel dengan 3 replikasi pada masing-masing konsentrasi.

Penentuan Kadar Vankomisin dalam *Spiked*-plasma

Sebanyak 200 µL sampel *spiked*-plasma vankomisin di dalam mikrotube ditambahkan pelarut 400 µL metanol sebagai pengendap protein. Campuran divortex selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 400 µL supernatan diambil dan ditambahkan pelarut 500 µL HCl pH 3 dan 1 mL diklorometan. Kemudian campuran divortex selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Fase air diambil dan disaring menggunakan syringe filter

0,2 μm , selanjutnya sebanyak 20 μL sampel diinjeksikan ke alat KCKT-UV.

Analisis Data

Parameter yang digunakan untuk kriteria penerimaan presisi adalah persen koefisien variasi (% CV) dengan persyaratan % CV tidak boleh lebih dari $\pm 15\%$, kecuali untuk batas terendah yaitu 3,0 $\mu\text{g/mL}$ (LLOQ) tidak boleh lebih dari $\pm 20\%$. Sementara itu, untuk parameter akurasi menggunakan persen diferensiasi (% diff) dengan kriteria nilai % diff tidak boleh lebih dari $\pm 15\%$, kecuali untuk batas terendah (LLOQ) tidak boleh lebih dari $\pm 20\%$. Hasil uji stabilitas menggunakan nilai % diff dengan syarat keberterimaan keberterimaan $\leq 15\%$, sesuai dengan kriteria yang ditetapkan *European Medicine Agency* (EMA) (Anonim, 2011).

Hasil dan Pembahasan

Sebagai studi pendahuluan, dilakukan optimasi sistem kromatografi berupa variasi jumlah campuran pelarut fase gerak yang digunakan. Hasil sistem kromatografi terpilih menghasilkan nilai CV 1,21% pada injeksi *spiked-plasma* vankomisin 3,0 $\mu\text{g/mL}$ dengan kisaran waktu retensi menit ke 5,613 hingga 5,811. Perolehan waktu retensi ini

dinilai cukup ideal untuk aplikasi pada pemantauan kadar obat dalam darah (PKOD), karena puncak analit akan terhindar dari pengaruh puncak senyawa endogen dan metabolit obat yang lebih polar di dalam plasma. Dilakukan pula perhitungan nilai uji kesesuaian sistem berupa faktor kapasitas (k) 1,2; faktor tailing ≤ 2 ; jumlah plat (N) 855; resolusi sebesar 1,6. Meskipun menghasilkan nilai jumlah plat yang relatif kecil, ketiga parameter lain telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan.

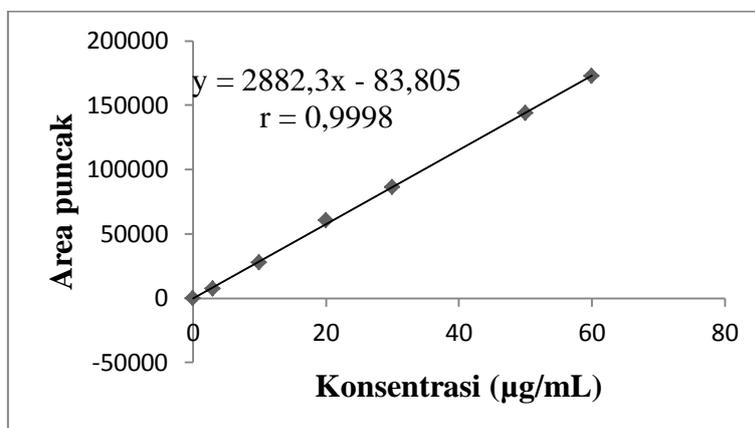
Linearitas Kurva Baku *Spiked-plasma* Vankomisin

Metode bioanalisis vankomisin dalam plasma yang dilakukan menggunakan teknik kuantifikasi standar eksternal kalibrasi ganda. Mengingat variasi farmakokinetika yang tinggi pada pasien yang menerima terapi obat vankomisin, maka digunakan rentang kadarnya yang cukup lebar. Integrasi area puncak menggunakan model *exponentially modified Gaussian* (EMG) dengan pendekatan *valley-to-valley event* (empower2), yaitu pengukuran area puncak dimulai dari titik awal hingga titik akhir puncak (Dyson, 1998). Hasil penelitian menghasilkan nilai persamaan regresi linear $y=2882,3x-$

Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Spiked-plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor UV ...

83,805 (**Gambar 1**) dengan nilai koefisien korelasi (R) 0,9998. Berdasarkan pendekatan nilai simpangan baku residual dari

persamaan regresi diperoleh nilai *Limit of Detection* (LoD) 1,56 µg/mL, sedangkan nilai *Limit of Quantification* (LoQ) 4,73 µg/mL.

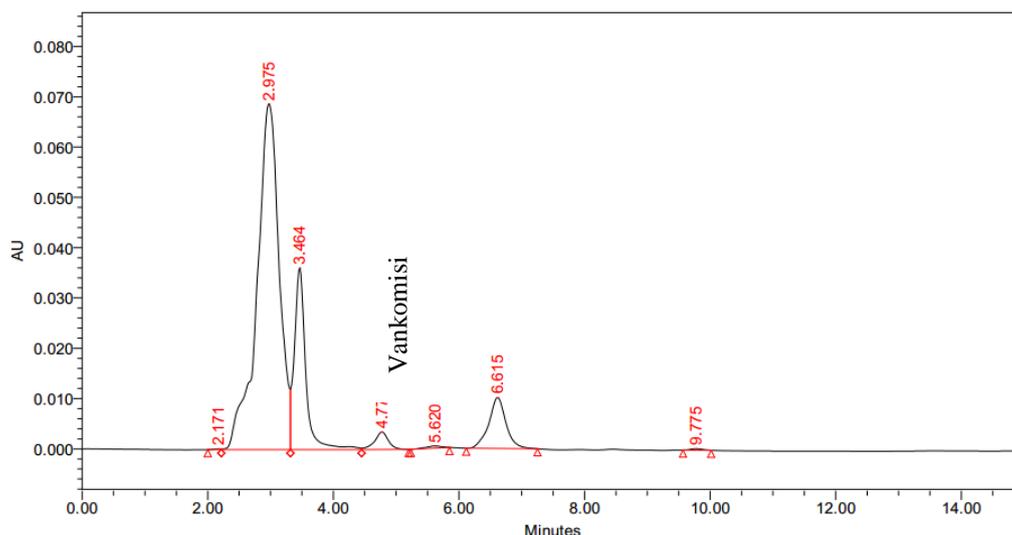


Gambar 1. Kurva kalibrasi vankomisin dalam plasma

Nilai koefisien korelasi yang diperoleh telah memenuhi persyaratan dengan rekomendasi keberterimaan sebesar $r > 0,999$ (Anonim, 1994) yang bermakna bahwa terdapat korelasi antara area puncak dan konsentrasi vankomisin yang terukur. Dengan demikian, dapat dinyatakan bahwa metode bioanalisis vankomisin dalam *spiked*-plasma dengan rentang konsentrasi 0 µg/mL - 60 µg/mL yang dikembangkan memenuhi parameter persyaratan uji linearitas.

Selektivitas

Selektivitas dilakukan pada 6 sampel plasma yang berasal dari 6 individu yang berbeda dengan tujuan mengidentifikasi pengaruh keberadaan senyawa-senyawa pengganggu terhadap pengukuran analit pada kadar LLoQ 3,0 µg/mL. Pengujian selektivitas (**Gambar 2**) metode menunjukkan nilai CV sebesar 9,06 %, sedangkan nilai % *diff* untuk masing-masing enam sumber plasma berada pada rentang -12,26 hingga 8,75 %.



Gambar 2. Kromatogram uji selektivitas vankomisin dalam *spiked*-plasma

Keterangan: vankomisin *spiked*-plasma konsentrasi 3,0 $\mu\text{g/mL}$; Fase diam C_{18} ; Fase gerak dan pelarut 5 mM KH_2PO_4 pH 3,0 : metanol (80:20); laju alir 1 mL/menit; volume injek 20 μL dan λ 213 nm

Gambar 2 menunjukkan waktu retensi vankomisin yakni pada menit ke-5,620 dengan profil puncak yang terpisah antara senyawa vankomisin dengan senyawa-senyawa lain yang memungkinkan dapat mengganggu interpretasi hasil. Durasi analisis penentuan kadar vankomisin yang hanya memerlukan waktu kurang dari 15 menit, menunjukkan metode ini dapat digunakan untuk aplikasi PKOD yang memang membutuhkan waktu relatif cepat dalam penyediaan hasil pengukuran kadar obatnya. Hal ini dilakukan untuk memenuhi kebutuhan darurat penyesuaian dosis dan diagnosis ketoksikan obat yang merekomendasikan bahwa hasil pemeriksaan kadar obat dapat diperoleh maksimal dalam waktu 24 jam (Kang

dan Lee, 2009). Dengan demikian, dapat segera diupayakan tindakan medis selanjutnya demi keselamatan pasien yang menggunakan vankomisin. Selain itu, perolehan nilai CV dan % *diff* menunjukkan terpenuhinya persyaratan yang ditetapkan, sehingga metode bioanalisis yang dikembangkan pada penelitian ini memiliki selektivitas yang baik, mampu memisahkan serta mengkuantifikasi kadar vankomisin dari senyawa-senyawa yang dapat mengganggu proses analisis, serta tidak dipengaruhi oleh perbedaan sumber plasma.

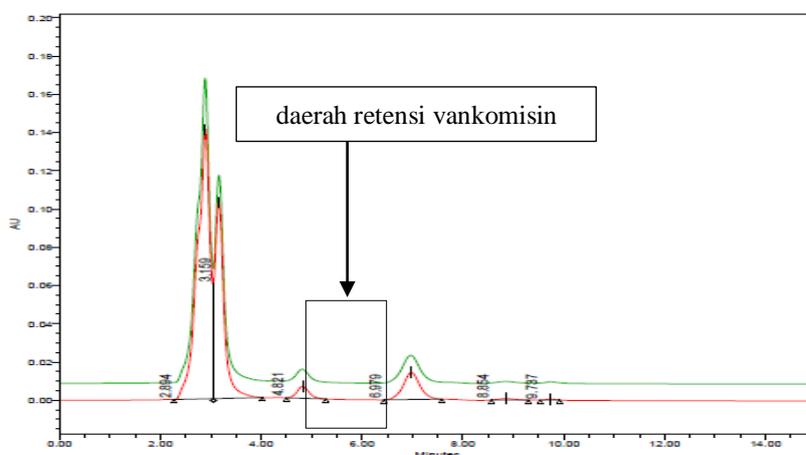
Hasil Uji *Carry-over*

Uji *carry-over* merupakan pengujian untuk menentukan ada tidaknya keterikutan analit dalam

Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Spiked-plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor UV ...

sampel blanko plasma setelah analisis pada konsentrasi tinggi. Kejadian *carry-over* sebaiknya diminimalkan selama proses pengembangan metode analisis karena dapat memengaruhi pembacaan analit serta perolehan nilai akurasi dan presisi suatu metode. Penentuan *carry-over* dilakukan dengan membandingkan

area blanko plasma yang dihasilkan setelah pembacaan analit pada konsentrasi tinggi (ULoQ) dengan area LLoQ. Nilai *Carry-over* sebaiknya tidak lebih dari 20% LLoQ atau tidak lebih dari 5% standar internal (Anonim, 2011). Hasil uji *carry-over* pada penelitian ini tertera pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Kromatogram hasil uji *carry-over* blanko plasma

Keterangan: hasil overlay kromatogram blanko plasma (2 replikasi) yang dianalisis setelah penginjeksian sampel vankomisin *spiked*-plasma konsentrasi tinggi (ULoQ 60 µg/mL) tidak dihasilkan puncak pada kisaran waktu retensi vankomisin

Gambar 3 menunjukkan kromatogram blanko plasma tidak menunjukkan adanya puncak senyawa vankomisin yang membuktikan bahwa tidak ada analit vankomisin dalam blanko plasma yang terikut setelah analisis pada konsentrasi tinggi. Hasil tersebut telah memenuhi parameter persyaratan yang ditetapkan oleh *European Medicines Agency* yaitu < 20% LLoQ (Anonim, 2011) sehingga dapat disimpulkan bahwa pembacaan

sampel dapat dilakukan secara acak tanpa memperhatikan urutan konsentrasi analit. Pada kasus ketoksikan vankomisin, kadar tunak minimal vankomisin dapat mencapai lebih dari 30 µg/mL (Tuon dkk., 2018).

Akurasi dan Presisi

Akurasi dan presisi dilakukan pada konsentrasi LLoQ, QCL, QCM, dan QCH yaitu 3,0 µg/mL; 15 µg/mL; 31,5 µg/mL; dan 48 µg/mL, berturut-turut, dan dilakukan 5 replikasi pada

tiap konsentrasi. Hasil uji akurasi dan presisi dilakukan pada intra-hari (Tabel

1.) maupun antar-hari (Tabel 2.).

Tabel 1. Hasil uji akurasi dan presisi intra-hari *spiked*-plasma vankomisin

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV	% diff
3	2,71	2,59	0,11	4,10%	-9,83%
	2,44				-18,79%
	2,62				-12,80%
	2,65				-11,72%
	2,53				-15,76%
15	15,46	15,52	0,25	1,60%	3,08%
	15,53				3,53%
	15,50				5,94%
	15,89				3,30%
	15,20				1,31%
31,5	31,99	33,60	1,50	4,47%	1,55%
	32,07				1,82%
	34,42				9,27%
	35,36				12,24%
	34,18				8,49%
48	54,55	52,05	1,50	2,89%	13,65%
	51,51				7,32%
	51,43				7,15%
	50,59				5,40%
	52,15				8,64%

Pada pengujian akurasi dan presisi vankomisin dalam *spiked*-plasma intra-hari (*within day*) diperoleh nilai % *diff* dan CV yang memenuhi persyaratan *European Medicines Agency* yaitu kurang dari 15% tiap konsentrasi dan kurang dari 20% pada LLoQ. Pada konsentrasi LLoQ yaitu 3 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh % *diff* dengan rentang - 18,79% – (-9,83)% dan CV sebesar 4,10%, pada QCL yaitu 15 $\mu\text{g/mL}$

diperoleh % *diff* dengan rentang 1,31% - 5,94% dan CV sebesar 1,60%, pada QCM yaitu 31,5 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh % *diff* dengan rentang 1,55% - 13,65% dan CV sebesar 4,47%, serta pada QCH yaitu 48 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh % *diff* dengan rentang 5,40% - 13,65% dan CV sebesar 2,89%. Hal ini bermakna bahwa pada pengujian intra-hari, kadar vankomisin yang diperoleh memiliki kedekatan dengan kadar yang diketahui

Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Spiked-plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor UV ...

serta pengujian dari tiap replikasinya memiliki kedekatan satu dengan lainnya.

Tabel 2. Hasil uji akurasi dan presisi antar-hari *spiked*-plasma vankomisin

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV	% diff
3,0	2,70	0,19	7,08 %	-18,79 – 3,47 %
15,0	15,41	1,13	7,36 %	-13,06-13,40 %
31,5	32,27	2,49	7,73 %	-13,71-9,93 %
48	50,20	3,00	5,97 %	-13,65-13,20 %

Pada pengujian akurasi dan presisi vankomisin dalam *spiked*-plasma antar-hari (*between run*) pada konsentrasi QCM diperoleh nilai % *diff* dan CV yang memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 15%. Pada konsentrasi QCH yaitu 48 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh % *diff* dengan rentang -13,65% - 13,20% dan CV sebesar 5,97%. Maknanya pada pengujian vankomisin dalam *spiked*-plasma antar hari vankomisin pada kadar 48 $\mu\text{g/mL}$ yang diperoleh memiliki kedekatan dengan kadar yang diketahui serta pengujian dari tiap replikanya memiliki kedekatan satu dengan lainnya.

Hasil Uji Stabilitas

Uji stabilitas vankomisin dalam *spiked*-plasma dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya degradasi analit dalam matriks plasma selama proses analisis, mulai dari penyiapan

sampel hingga proses analisis selesai. Hal ini bertujuan untuk menjamin hasil analisis yang diperoleh tetap akurat dan memenuhi kriteria keberterimaan. Nilai *Quality Control-Low* (QCL) dan *Quality Control-High* (QCH) digunakan sebagai konsentrasi untuk menentukan uji stabilitas vankomisin dalam *spiked*-plasma. Nilai QCL diperoleh dari 5 kali nilai LLoQ, sementara nilai QCH diperoleh dari 80% kadar tertinggi kurva kalibrasi (ULoQ).

Hasil uji stabilitas jangka pendek *spiked*-plasma vankomisin menghasilkan nilai %*diff* pada sampel QCL sebesar 8,59 hingga 13,06 (pada jam ke-0), -4,43 hingga 0,64 (pada jam ke-6), -9,09 hingga -5,18 (pada jam ke-24), sedangkan pada sampel QCH diperoleh hasil %*diff* jam ke-0, jam ke-6, dan jam ke-24 masing-masing sebesar -5,98 – 9,85; 5,00 – 6,04; 5,03-10,02, berturutan. Sementara itu, hasil

uji stabilitas jangka panjang *spiked-plasma* vankomisin diperoleh nilai *%diff* pada sampel QCL hari ke-0 sebesar 8,59 hingga 13,06; hari ke-7 sebesar -9,62 hingga -7,10, hari ke-14 sebesar -10,65 hingga -6,95, hari ke-21 sebesar -8,72 hingga -2,49, sedangkan untuk sampel QCH diperoleh nilai *%diff* pada hari ke-0 sebesar 5,78 hingga 9,85; hari ke-7 sebesar -1,34 hingga 1,71; hari ke-14 sebesar 2,12 hingga 5,26; hari ke-21 sebesar -7,65 hingga -4,50.

Berdasarkan hasil uji stabilitas tersebut diketahui bahwa analit vankomisin dalam matriks plasma tidak mengalami degradasi melebihi dari batas yang dipersyaratkan yaitu dengan perolehan nilai *%diff* uji stabilitas vankomisin *spiked-plasma* jangka pendek dan jangka panjang telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh *European Medicine Agency* yaitu $\leq 15\%$ (Anonim, 2011), sehingga dapat disimpulkan bahwa vankomisin mampu stabil dalam plasma selama 24 jam pada suhu kamar (25°C) dan dapat stabil pada suhu penyimpanan -20°C selama 21 hari.

Diketahui bahwa stabilitas sampel tidak hanya dipengaruhi oleh lama waktu penyimpanan, melainkan juga proses pada sampel juga perlu

diperhatikan. Selama proses analisis, dimungkinkan sampel mengalami proses penyimpanan dan proses pembekuan untuk selanjutnya dianalisis pada suhu kamar (25°C). Oleh karena itu, uji stabilitas beku-cair penting dilakukan untuk memastikan kestabilan analit dalam matriks plasma selama proses penyimpanan (-20°C) hingga proses analisis pada suhu kamar (25°C). Uji ini dilakukan sebanyak 3 siklus beku-cair. Satu siklus dihitung setelah sampel mengalami pembekuan selama minimal 12 jam kemudian dicairkan kembali pada suhu ruang (25°C).

Hasil uji stabilitas sampel beku-cair menunjukkan nilai *%diff* pada konsentrasi QCL baik pada siklus ke-0 dan ke-3 diperoleh nilai *%diff* tidak lebih dari $\pm 15\%$. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa vankomisin dalam *spiked-plasma* stabil selama penyimpanan (-20°C) hingga proses analisis pada suhu kamar (25°C) dan juga tetap dapat terjaga stabilitasnya setelah mengalami 3 kali siklus pembekuan dan pencairan (Anonim, 2011).

Selain itu, uji stabilitas paska preparasi atau disebut uji stabilitas *autosampler* juga dilakukan untuk mengetahui stabilitas analit setelah

menjalani proses ekstraksi dan disimpan pada wadah yang digunakan untuk analisis berikutnya. Hasil uji stabilitas *autosampler* menunjukkan bahwa vankomisin yang disimpan dalam *autosampler* mampu tetap stabil selama 24 jam pada suhu kamar (25°C) setelah proses ekstraksi berlangsung. Hal ini ditunjukkan dari perolehan nilai *%diff* yang telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh *European Medicine Agency* yaitu tidak lebih dari $\pm 15\%$ dengan hasil *%diff* konsentrasi QCL pada jam ke-0, ke-6, dan ke-24 masing-masing sebesar 8,59 hingga 13,06; -4,43 hingga -1,64; -11,72 hingga -9,64, berturut-turut. Sementara itu, pada konsentrasi QCH diperoleh nilai *%diff* sebesar -5,98 hingga 9,85; -8,86 hingga -5,35; -1,01 hingga 1,34 masing-masing pada jam ke-0, ke-6, dan ke-24, berturut-turut. Perolehan hasil uji stabilitas ini menunjukkan bahwa matriks plasma tidak memengaruhi stabilitas vankomisin selama proses analisis berlangsung serta analit vankomisin tidak mengalami degradasi melebihi batas ketentuan berdasarkan perolehan nilai *%diff* seluruh tahap uji stabilitas tidak melebihi $\pm 15\%$ (Anonim, 2011). Namun bagaimana pun, sampel plasma pasien yang

memerlukan tindakan pemantauan obat dalam darah diharapkan dapat dilakukan secepat mungkin (kurang dari 24 jam) agar pasien mendapatkan pengobatan dengan dosis yang tepat.

Secara umum, perolehan persamaan regresi linier vankomisin dalam *spiked*-plasma dengan koefisien korelasi yang memenuhi syarat keberterimaan dengan perolehan nilai LLoQ, LoD, dan LoQ yakni 3,0 $\mu\text{g/mL}$, 1,56 $\mu\text{g/mL}$, dan 4,73 $\mu\text{g/mL}$, berturut-turut, membuktikan bahwa metode bioanalisis yang dikembangkan dapat digunakan untuk aplikasi PKOD vankomisin pada ranah klinis. Hal ini berdasarkan kisaran terapeutik vankomisin dalam darah yaitu sebesar 5-40 $\mu\text{g/mL}$ (Ritschel dan Kearns, 2004.). Dengan demikian, metode ini dapat digunakan untuk pengembangan aplikasi TDM vankomisin dan keperluan klinis lainnya seperti studi farmakokinetika vankomisin terutama pada konsentrasi tunak.

Kesimpulan

Perolehan parameter hasil uji validasi metode bioanalisis vankomisin dalam *spiked*-plasma telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh *European Medicine Agency* (EMA). Dengan

demikian, metode ini dapat digunakan untuk aplikasi PKOD vankomisin dan keperluan klinis lainnya seperti studi farmakokinetika vankomisin terutama pada konsentrasi tunak. Penelitian ini merekomendasikan waktu pemeriksaan kadar vankomisin dalam plasma pasien dilakukan maksimal 24 jam setelah penerimaan sampel. Sementara itu, untuk keperluan studi farmakokinetika vankomisin lainnya, vankomisin tetap stabil selama 21 hari pada suhu penyimpanan -20°C .

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih diucapkan kepada Laboratorium Jurusan Farmasi FMIPA UII dan DPPM UII atas pendanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Abu-Shandi, K.H., 2009. Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395: 527–532.
- Anonim, 1994. *Guideline Validation of Chromatographic Methods*. Center for Drug Evaluation and Research, London.
- Anonim, 2011. *Guideline on Bioanalytical Method Validation*. European Medicine Agency, London.
- Anonim, 2012. *Drug Information Handbook*. American Pharmacist Association, 20th ed. Lexi-Com, Ohio, USA
- Bauer, L.A., 2008. *Applied Clinical Pharmacokinetics*, 2nd ed. The Graw-Hill Companies, New York.
- Dyson, N., 1998. *Chromatographic Integration Methods*, 2nd ed. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, MPG Books Ltd, Cornwall UK.
- Farin, D., Piva, G.A., Gozlan, I., dan Kitzes-Cohen, R., 1998. A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18: 367–372.
- Hagihara, M., Sutherland, C., dan Nicolau, D.P., 2013. Development of HPLC Methods for the Determination of Vancomycin in Human Plasma, Mouse Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Journal of Chromatographic Science*, 51: 201–207.
- Johnson, J.L.H. dan Yalkowsky, S.H., 2006. Reformulation of a new vancomycin analog: An example of the importance of buffer species and strength. *AAPS PharmSciTech*, 7: E33–E37.
- Kang, J.-S. dan Lee, M.-H., 2009. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 24: 1–10.
- Khudaibergenova, M.S., 2015. Antimicrobial use at a multi-disciplinary hospital.

Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Spiked-plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor UV ...

International Journal of Risk & Safety in Medicine, 27: S13–S14.

with an immunoassay (PETINIA).
SpringerPlus, 5

- Li, L., Miles, M.V., Hall, W., dan Carson, S.W., 1995. An Improved Micromethod for Vancomycin Determination by High-Performance Liquid Chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*, 17: 366.
- Oyaert, M., Peersman, N., Kieffer, D., Deiteren, K., Smits, A., Allegaert, K., dkk., 2015. Novel LC–MS/MS method for plasma vancomycin: Comparison with immunoassays and clinical impact. *Clinica Chimica Acta*, 441: 63–70.
- Ritschel, W. dan Kearns, G., 2004. *Handbook of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications*, sixth. ed. American Pharmacist Association, Washington DC.
- Shargel, L., Yu, A.B.C., dan Wu-Pong, S., 2012. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, 6th ed. ed. McGraw-Hill, New York.
- Tuon, F.F., Romero, R., Gasparetto, J., dan Cieslinski, J., 2018. 'Vancomycin trough level and loading dose', *Infection and Drug Resistance*. URL: <https://www.dovepress.com/vancomycin-trough-level-and-loading-dose-peer-reviewed-article-IDR> (diakses tanggal 7/1/2019).
- Usman, M. dan Hempel, G., 2016. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison