

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penelitian Terdahulu

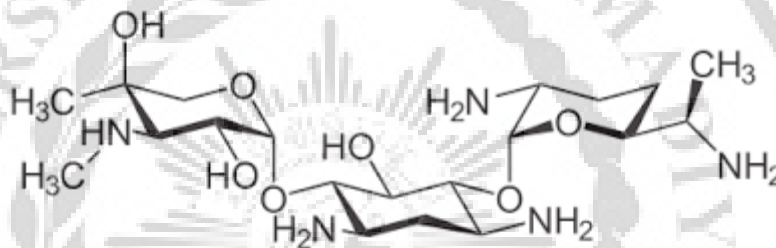
(Isoherranen & Soback, 2000) dalam penelitiannya melakukan penentuan Gentamisin C_1 , C_{1a} dan C_2 dalam plasma dan urin dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Penelitian ini menjelaskan pengembangan metode KCKT untuk analisis komponen gentamicin C_1 , C_{1a} dan C_2 dalam plasma dan urin. Tiga komponen diisolasi dengan preparasi kromatografi preparasi dan identitas yang diverifikasi oleh kromatografi lapis tipis, KCKT, spektrometri massa, spektroskopi resonansi magnetik nuklir dan penentuan titik lebur. Gentamisin diekstraksi dari matriks biologis dengan menggunakan buffer Tris dan ekstraksi fase padat fase polimer. Derivatisasi dilakukan dalam kartrid ekstraksi fase padat dengan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Derivatif 2,4-dinitrofenil dipisahkan dengan KCKT fase terbalik dan diukur dengan absorbansi ultraviolet pada 365 nm. Hasil yang diperoleh respon detektor adalah linear dari batas kuantifikasi hingga 50 mg/L untuk masing-masing komponen. Batas kuantifikasi adalah 0,07 mg/L untuk gentamisin C_1 dan 0,1 mg/L untuk gentamisin C_2 dan C_{1a} . Pemulihan komponen gentamisin adalah 72% dari plasma dan 98% dari urin. Metode ini divalidasi untuk plasma manusia dan anjing dan urin. Kesimpulannya metode ini dapat diulang dan memungkinkan analisis gentamisin C_1 , C_{1a} dan C_2 dalam plasma dan urin dalam konsentrasi yang mencakup kisaran terapeutik obat, sehingga cocok untuk pemantauan obat terapeutik dan studi farmakokinetik.

(Company, 1982) melakukan hal yang sama dengan (Isoherranen & Soback, 2000). Fase gerak yang digunakan untuk analisis (Company, 1982) menggunakan fase gerak yang terdiri dari 70% asetonitril dalam tris (hidroksimetil) aminometana (1 g/L disesuaikan dengan pH 3.0 dengan 1 M asam klorida). Panjang gelombang eksitasi ditetapkan pada 340 nm. Solusi ini dilewatkan melalui filter 0,45 μ m dan mengalami degassed di bawah vakum, laju aliran dipertahankan pada 1,5 ml/mm dan kromatografi dilakukan pada suhu kamar.

(Walker & Coates, 1981) melakukan metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk penentuan Gentamisin dalam cairan biologis. Metode selektif dan sensitif untuk penentuan Gentamisin dalam plasma dan urin dengan kromatografi cair kinerja tinggi telah dikembangkan. Setelah deproteinisasi, gentamisin direaksikan dengan fluorescamin untuk menghasilkan turunan fluoresen. Campuran reaksi ini secara langsung dikromatografi pada kolom penukar kation menggunakan fase gerak asetonitril-asam fosfat (7: 3). Komponen Gentamisin dielusi sebagai puncak tunggal. Menggunakan 0,1 ml plasma, kuantisasi Gentamisin konsentrasi serendah 1 mg/L dimungkinkan.

2.2 Landasan Teori

2.2.1 Gentamisin



Gambar 2.1 Rumus struktur gentamisin (Ganiswara, 1995)

Gentamisin ($C_{21}H_{43}N_5O_7$) berbentuk serbuk agak keputih-putihan, larut baik dalam air, tidak larut dalam alkohol, aseton, kloroform, eter dan benzene. Gentamisin memiliki titik lebur $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan berat molekul 477,5954 gr/mol. Dari segi kimia senyawanya merupakan gula amino dengan ikatan glikosidik pada inti heksosa yang larut dalam air, stabil dalam larutan, dan lebih aktif pada pH alkali dibandingkan pH asam.

Gentamisin merupakan prototip golongan aminoglikosida. Aminoglikosida adalah sekelompok obat-obatan bakterisid yang berasal dari berbagai spesies *Streptomyces* dan mempunyai sifat kimiawi, antimikroba, farmakologi dan efek toksik yang sama. Selain gentamisin, yang termasuk golongan aminoglikosida adalah streptomisin, kanamisin, neomisin, amikasin, tobramisin, sisomisin,

netilmisin, dll. Namun saat ini yang paling sering digunakan seperti gentamisin, tobramisin dan amikasin (Katzung dkk, 2009).

Aminoglikosida adalah salah satu antibiotik pilihan untuk menangani infeksi serius. Penggunaan antibiotik ini diindikasikan karena mempunyai spektrum luas terutama terhadap infeksi kuman aerob gram negatif, dan berefek sinergis terhadap gram positif bila dikombinasikan dengan antibiotik lain (misalnya β -laktam) (Rose, 2005).

Antibiotik ini mempunyai spektrum yang luas terhadap kuman aerob dan fakultatif basil gram negatif. Aktifitasnya terutama terhadap *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, dan *Klebsiella sp*, *Morganella sp*, *Citrobacter sp*, *Serratia sp* dan *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp* dan *Haemophilus influenza* (Paul & Leibovici, 2009).

Aktifitas gentamisin adalah bakterisid, berdasarkan dayanya untuk menembus dinding bakteri dan mengikat diri pada ribosom (partikel-partikel kecil dalam protoplasma sel yang kaya akan RNA, tempat terjadinya sintesa protein) di dalam sel. Proses translasi (RNA dan DNA) diganggu sehingga biosintesa protein dikacaukan. Untuk menembus dinding bakteri mencapai ribosom, aminoglikosida yang bermuatan kation positif akan berikatan secara pasif dengan membran luar dinding kuman gram negatif yang mengandung muatan negatif (Radigan dkk, 2009).

Terjadinya reaksi kation antibiotik akibat adanya potensial listrik transmembran sehingga menimbulkan celah atau lubang pada membran luar dinding kuman selain mengakibatkan kebocoran dan keluarnya kandungan intraseluler kuman memungkinkan penetrasi antibiotik semakin dalam hingga menembus membran sitoplasma, proses ini merupakan efek bakterisid aminoglikosida (Radigan dkk, 2009).

Semua golongan aminoglikosida mempunyai sifat farmakokinetik yang hampir sama. Lima belas sampai tiga puluh menit paska

pemberian intravena mengalami distribusi ke ruang ekstraseluler dan konsentrasi puncak dalam plasma dialami setelah 30-60 menit paska pemberian. Waktu paruh aminoglikosida rerata antara 1,5 hingga 3,5 jam pada fungsi ginjal yang normal, waktu paruh ini akan memendek pada keadaan demam dan akan memanjang pada penurunan fungsi ginjal (Radigan dkk, 2009).

Ikatan aminoglikosida dan protein sangat lemah (protein binding < 10%) dan eliminasi obat ini terutama melalui filtrasi glomerulus. Lebih 90% dari dosis aminoglikosida yang diberikan secara intravena akan terdeteksi pada urin dalam bentuk utuh pada 24 jam pertama, sebagian kecil secara perlahan akan mengalami resiklus ke dalam lumen tubulus proksimalis, akumulasi dari resiklus ini yang akan mengakibatkan toksik ginjal.

Volume distribusi aminoglikosida adalah 0,2-0,3 L/k. Volume ini setara dengan cairan ekstraseluler sehingga akan mudah tercapai konsentrasi terapeutik dalam darah, tulang, cairan sinovial, peritonium, mempunyai konsentrasi distribusi pada paru dan otak (Radigan dkk, 2009).

2.2.2 Plasma

Darah terdiri atas plasma dan sel-sel darah. Sebagian besar sel darah merupakan sel darah merah atau eritrosit, sedangkan jumlah sel darah putih atau leukosit relative sangat sedikit, yaitu 0,2% dari jumlah eritrosit. Disamping eritrosit dan leukosit, ada partikel lain yang disebut trombosit. Trombosit sangat berguna pada proses penggumpalan darah (Pudjiadi, 1994).

Apabila darah yang sebelumnya telah diberi antikoagulan dilakukan sentrifugasi, maka sel-sel darah merah akan mengendap sedangkan plasma akan berada dalam bentuk cairan bening atau supernatan di atasnya. Volume rata-rata plasma pada pria adalah 55%, pada wanita 58% dari volume darah (Sherwood, 1996). Plasma manusia mengandung 90-92% air. Peranan air dalam darah sangat besar, sebab disamping sebagai pelarut zat-zat, air diperlukan untuk

menjaga tekanan darah, kondisi osmotik, dan pengatur suhu tubuh dengan meratakan panas tubuh (Pudjiadi, 1994).

Zat-zat yang terdapat dalam plasma diantaranya adalah protein darah; garam-garam mineral (garam kalsium, kalium, natrium, dan lain-lain) yang berguna dalam metabolisme dan juga mengadakan osmotik; zat makanan (asam amino, glukosa, lemak, mineral, dan vitamin); hormone; dan antibody/antitoksin (Syaifuddin, 2006). Protein adalah zat padat yang paling banyak terdapat di dalam plasma, yaitu antara 6-8% dari plasma. Protein yang terdapat di dalam plasma antara lain adalah fibrinogen, globulin, dan albumin. Albumin dan globulin merupakan protein yang paling banyak terdapat dalam plasma yang berfungsi sebagai zat yang menentukan besarnya tekanan osmotik (Pudjiadi, 1994). Adapun fibrinogen merupakan suatu protein darah yang sangat berguna dalam peristiwa penggumpalan darah. Plasma masih terdapat fibrinogen di dalamnya, hal ini disebabkan fibrinogen tidak berubah menjadi fibrin karena penambahan antikoagulan (Sadikin, 2001).

2.2.3 Analisis Obat dalam Plasma

Penentuan kadar obat dalam sampel biologis merupakan hal yang sangat penting dalam evaluasi dan interpretasi data farmakokinetika. Cairan biologis yang umum digunakan untuk analisis adalah darah, plasma (serum), dan urin.

Analisis konsentrasi obat dalam darah biasanya tidak digunakan dalam farmakokinetik karena darah merupakan system fisik kompleks yang mengandung sel darah merah, sel darah putih dan platelet yang tersuspensi dalam plasma. Darah dengan elemen selular yang telah dihilangkan dengan sentrifugasi (plasma) atau pembekuan (serum) lebih disukai (Rosenbaun, 2011). Sampel biologis yang paling umum digunakan adalah plasma karena hubungan konsentrasi obat dalam plasma dengan efek terapeutik yang ditimbulkan baik (Kelly, 1992).

Pemeriksaan kadar obat dalam plasma merupakan suatu metode yang sesuai untuk pemantauan pengobatan dan memungkinkan untuk

penyesuaian dosis obat dan mengoptimasi terapi (Shargel *et al.*, 2005). Salah satu keuntungan dari KCKT adalah dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah sehingga dapat digunakan untuk konsentrasi obat dalam plasma yang diukur mencapai level microgram sampai nanogram atau pikogram (Johnson & Stevenson, 1991).

Pada matriks biologis seperti plasma mengandung sejumlah besar komponen endogen yang dapat mengganggu analisis dimana sebagian besar obat akan berikatan dengan protein plasma sehingga harus dibebaskan terlebih dahulu. Oleh karena itu, diperlukan preparasi sampel dengan tujuan agar dapat memisahkan atau mengisolasi obat yang akan ditentukan dari komponen endogen plasma yang dapat mengganggu analisis, membebaskan obat dari sisi pengikatan protein dan memekatkan obat agar diperoleh analisis yang sensitive. Kegiatan preparasi sampel merupakan hal penting dalam bioanalisis (Harahap, 2010).

Beberapa teknik preparasi sampel yang digunakan untuk mengisolasi obat dari matriks biologis antara lain :

2.2.3.1 Pengendapan protein

Pada metode ini, dapat dilakukan dengan cara penambahan asam atau pelarut organik untuk mendenaturasi dan mengendapkan protein. Penambahan asam pada konsentrasi 5-20% seperti asam trikloroasetat (TCA) dan asam perkolat, sangat efisien untuk mengendapkan protein. Penambahan larutan yang berisi ion logam berat atau penambahan pelarut organik seperti methanol, etanol, asetonitril dan aseton ke dalam sampel biologis telah digunakan secara luas dalam bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT, meskipun memiliki efisiensi yang relative rendah dalam memisahkan protein. Pelarut organik akan mengendapkan protein berdasarkan prinsip polaritas dan menurunkan solubilitas protein (Evans *et al.*, 2004; Harahap, 2010).

2.2.3.2 Ultrafiltrasi

Larutan bebas protein dapat diperoleh melalui proses penyaringan dengan melewati larutan pada suatu membrane semipermeable yang selektif dengan menggunakan tekanan hidrostatik (1-10 atm) untuk memberikan dorongan dalam proses pemisahan (Harahap, 2010).

2.2.3.3 Ekstraksi cair-cair (*Liquid-liquid Extraction*)

Ekstraksi cair-cair adalah proses pemindahan atau pemisahan suatu komponen dari satu fase ke fase lainnya yang tidak saling bercampur satu sama lain, proses ini disebut partisi atau distribusi. Salah satu fasenya yaitu fase *aqueous* dan fase lainnya merupakan pelarut organik. Larutan *aqueous* yang dapat digunakan adalah air, larutan yang bersifat asam/basa, garam dan lainnya. Pelarut organik yang dapat digunakan adalah heksan, etil asetat, toluene dan lainnya. Pelarut organik non polar untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat lipofil,

sedangkan senyawa hidrofil lebih mudah larut dalam pelarut organik yang relatif polar.

Metode ekstraksi dengan pelarut organik merupakan cara yang paling umum digunakan untuk pemisahan parsial. pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi, karena obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik apabila dalam bentuk tidak terionisasi. Optimasi dapat dilakukan dengan menghitung atau menentukan pKa obat.

Penguapan dapat menggunakan bantuan evaporator vakum atau diuapkan pada temperatur kamar. Untuk mempercepat penguapan dapat ditambahkan beberapa tetes etanol, dan penambahan sedikit natrium sulfat anhidrat pada saat penyaringan dapat menghilangkan air dari fase organik. Selanjutnya hasil penguapan direkonstitusi menggunakan pelarut yang sesuai. Kelemahan dari metode yaitu terjadinya pembentukan emulsi dan tidak dapat diaplikasikan ke semua analit, contohnya metode ini sulit digunakan untuk analit yang bersifat sangat polar (Evans *et al.*, 2004); Harahap, 2010).

2.2.3.4 Ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction*)

Prinsip mekanisme pemisahan dan isolasi yang digunakan dalam pemisahan fase padat yaitu fase terbalik, fase normal dan *ion exchange* sama seperti yang digunakan dalam KCKT. Metode ekstraksi fase padat ini berdasarkan prinsip kromatografi. Prinsip umum dari ekstraksi fase padat yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam. Partikel silica berukuran 40-60 μm merupakan adsorben yang sering digunakan berkaitan dengan membentuk fase hidrokarbon. Adsorben yang paling baik kapasitasnya dalam mengadsorpsi analit adalah C_{18} .

Pada metode ini, digunakan kolom berukuran kecil (*cartridge*) dengan adsorben yang memiliki sifat mirip dengan sifat analit yang diperiksa. Ekstraksi fase padat adalah suatu

teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. Secara umum SPE menggunakan 5 tahap yaitu pengkondisian, penyeimbang fase diam, memasukkan sampel, pencucian untuk menghilangkan senyawa pengganggu, dan elusi sampel (Evans *et al.*, 2004); Harahap, 2010).

2.2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau biasa juga disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang. KCKT dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.

KCKT paling sering digunakan untuk : menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat, dan protein-protein dalam cairan fisiologis; menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat, produk hasil samping proses sintesis, atau produk-produk degradasi dalam sediaan farmasi; memonitor sampel-sampel yang berasal dari lingkungan; memurnikan senyawa dalam suatu campuran; memisahkan polimer dan menentukan distribusi berat molekulnya dalam suatu campuran; control kualitas; dan mengikuti jalannya reaksi sintesis.

Keterbatasan metode KCKT adalah untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrofotometer massa (MS) dan apabila sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.1 Keuntungan KCKT

KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fase gerak cairan dan fase diam cairan atau padat. Adapun keuntungan dari KCKT, yaitu : cepat, daya pisah baik, peka, detector unik, pemilihan kolom dan eluen

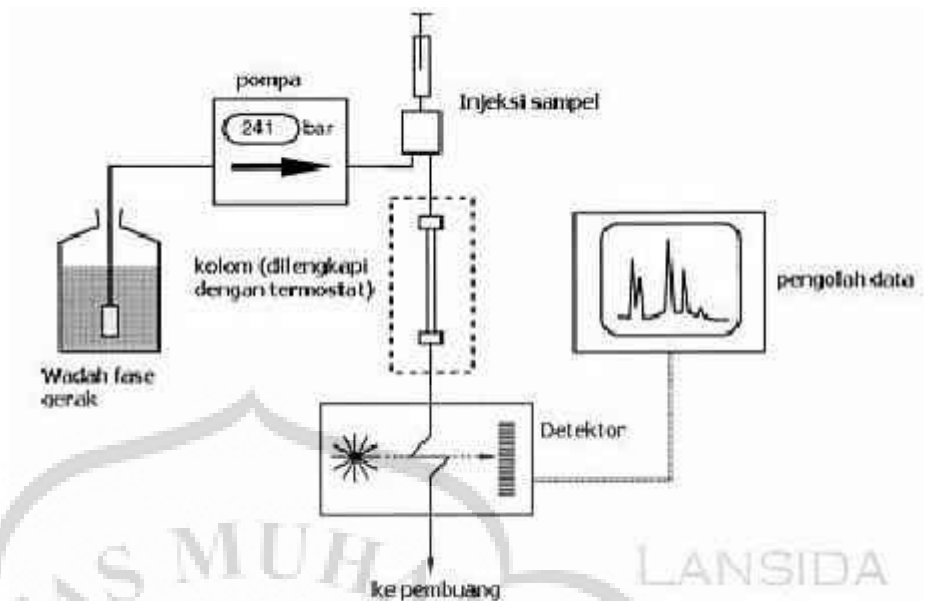
sangat bervariasi, dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah, kolom dapat dipakai kembali, ideal untuk molekul besar dan ion, mudah memperoleh kembali cuplikan, mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, mudah melaksanakannya, dapat dihindari terjadinya dekomposisi atau kerusakan bahan yang dianalisis dan resolusi yang baik (Johnson & Steveson, 1991; Effendy, 2004).

2.2.4.2 Cara kerja KCKT

Kromatografi adalah suatu istilah umum yang digunakan untuk bermacam-macam teknik pemisahan yang didasarkan atas partisi sampel diantara suatu fase gerak yang bias berupa gas ataupun cair dan fase diam yang juga bias berupa cairan ataupun padatan (Effendy, 2004). KCKT merupakan teknik yang mana solute atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solute-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solute-solut ini diatur oleh distribusi solute dalam fase gerak dan fase diam. Penggunaan kromatografi cair secara sukses terhadap suatu masalah yang dihadapi membutuhkan penggabungan secara tepat dari berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.3 Instrumentasi KCKT

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas tujuh komponen pokok yaitu : wadah fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan suatu computer atau integrator atau perekam (Gandjar & Rohman, 2007).



Gambar 2.3 Instrument KCKT (Settle, (Editor), 1997)

2.2.4.2.1 Wadah Fase Gerak pada KCKT

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah yang digunakan dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detector sehingga akan mengganggu analisis (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.2.2 Pompa pada KCKT

Pompa berfungsi untuk menggerakkan fase gerak melalui kolom (Johnson & Steveson, 1991). Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Pompa yang cocok untuk KCKT adalah pompa harus *inert* terhadap fase gerak. Bahan yang

umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, telfon, dan batu nilam. Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu : pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 ml/menit (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.2.3 Penyuntikan (*injector*) sampel pada KCKT

Injector berfungsi memasukkan sampel-sampel cair dan larutan ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom. Alat penyuntik terbuat dari tembaga tahan karat dan katup Teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal (Gandjar & Rohman, 2007). Ada dua ragam utama : aliran henti dan pelarut mengalir. Jenis-jenis dasar injector, yaitu : aliran henti, septum, katup jalan-kitar (Johnson & Steveson, 1991).

2.2.4.2.4 Kolom pada KCKT

Kolom merupakan jantung kromatografi. Keberhasilan atau kegagalan analisis bergantung pada pilihan kolom dan kondisi kerja yang tepat. Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu (Johnson & Steveson, 1991) :

- Kolom analitik : diameter dalam 2-6 mm. Panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan *pellicular*, panjang yang digunakan adalah 50-100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikel, 10-30 cm.

- Kolom preparative : umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25-100 cm.

2.2.4.2.5 Fase Diam pada KCKT

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silica yang dimodifikasi secara kimiawi, silica yang tidak dimodifikasi, polimer-polimer stiren dan divinilbenzen. Permukaan silica adalah polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH).

Silica dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen seperti klorosilan yang akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional yang lain. Hasil reaksi yang diperoleh disebut dengan silica fase terikat yang stabil terhadap hidrolisis karena terbentuk ikatan-ikatan siloksan (Si-O-O-Si). Silika yang dimodifikasi ini mempunyai karakteristik kromatografik dan selektifitas yang berbeda jika dibandingkan dengan silika yang tidak dimodifikasi.

Oktadesil silica (ODS atau C₁₈) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.2.6 Detektor KCKT

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif) (Johnson & Steveson, 1991). Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan

yaitu : detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrofotometri massa; dan golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detector UV-Vis, detektor flouresensi, dan elektrokimia.

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut (Gandjar & Rohman, 2007) :

- 1) Mempunyai respon terhadap solute yang cepat dan reproduibel,
- 2) Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solute pada kadar yang sangat kecil,
- 3) Stabil dalam pengoperasiannya,
- 4) Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita,
- 5) Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solute pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier), dan
- 6) Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.

Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV 254 nm. Variable panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan rentang yang lebih luas. Detektor indeks refraksi juga digunakan secara luas, terutama pada kromatografi eksklusi, tetapi umumnya kurang sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV (Johnson & Steveson, 1991). Beberapa

detektor yang sering digunakan pada KCKT (Gandjar & Rohman, 2007) :

- Detektor Spektrofotometri UV-Vis

Detektor ini didasarkan pada adanya penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) pada kisaran panjang gelombang 190-800 nm oleh spesies solute yang mempunyai struktur-struktur atau gugus-gugus kromofik. Detektor spektrofotometri UV-Vis dapat berupa detektor dengan panjang gelombang tetap (merupakan detektor yang paling sederhana) serta detektor dengan panjang gelombang bervariasi.

- Detektor *Photodiode-array* (PDA)

Detektor PDA merupakan detektor UV-Vis dengan berbagai keistimewaan. Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda pada sekali proses (*single run*). Selama proses berjalan, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan (biasanya antara 190-400) dapat ditampilkan.

- Detektor Fluoresensi

Fluoresensi merupakan fenomena luminesensi yang terjadi ketika suatu senyawa menyerap sinar UV atau visible lalu mengemisikannya pada panjang gelombang yang lebih besar. Tidak semua senyawa obat mempunyai sifat fluoresen sehingga detektor fluoresensi ini sangat spesifik. Disamping itu, detektor ini juga sangat sensitif dibandingkan dengan detektor UV.

- Detektor Indeks Bias

Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase gerak). Penggunaan detektor ini terutama untuk senyawa-senyawa yang tidak mempunyai gugus kromofor.

- Detektor Elektrokimia

Detektor ini bekerja berdasarkan oksidasi dan reduksi senyawa organik (termasuk obat) secara elektrokimia pada elektroda yang cocok. Kelebihan detektor ini adalah terkait dengan kepekaannya yang tinggi, sementara kelemahannya membutuhkan keterampilan dan latihan yang cukup untuk mengoperasikannya supaya didapatkan garis dasar (*baseline*) yang stabil.

2.2.4.2.7 Integrator

Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu mem-*plot*kannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dievaluasi oleh analisis (pengguna). Alat pengumpul data seperti komputer, integrator, atau rekorder, dihubungkan dengan detektor (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.4 Penggunaan KCKT dalam Analisis Farmasi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu metode pemisahan canggih dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bias dianalisis dengan Kromatografi Gas (Effendy, 2004). Metode KCKT merupakan metode yang sangat populer untuk menetapkan kadar senyawa obat baik

dalam bentuk sediaan maupun dalam sampel hayati. Hal ini disebabkan KCKT merupakan metode yang memberikan sensitifitas dan spesifitas yang tinggi (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.5 Analisis Kuantitatif

Mengukur luas puncak dari suatu komponen zat yang dianalisis merupakan dasar perhitungan kuantitatif. Beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu :

2.2.4.5.1 Metode Baku Eksternal

Metode yang paling umum untuk menetapkan konsentrasi senyawa yang tidak diketahui konsentrasinya dalam suatu sampel adalah menggunakan *plot* kalibrasi menggunakan baku eksternal. Larutan-larutan baku eksternal ini dirujuk sebagai baku eksternal karena larutan-larutan baku eksternal ini disiapkan dan dianalisis secara terpisah dari kromatogram senyawa tertentu yang ada dalam sampel. Sampel yang mengandung senyawa tertentu yang akan ditetapkan konsentrasinya dan telah disiapkan, selanjutnya diinjeksikan dan dianalisis dengan cara yang sama (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.4.5.2 Metode Baku Internal

Sejumlah baku internal ditambahkan pada sampel dan standar. Baku internal dapat menghilangkan pengaruh karena adanya perubahan-perubahan pada ukuran sampel atau konsentrasi karena variasi instrument. Salah satu alasan utama digunakan baku internal adalah jika suatu sampel memerlukan suatu perlakuan sampel yang sangat signifikan sehingga dapat mengakibatkan berkurangnya sampel. Jika baku internal ditambahkan pada sampel sebelumnya dilakukan

preparasi sampel, maka baku internal dapat mengoreksi hilangnya sampel-sampel ini. Syarat-syarat suatu senyawa dapat digunakan sebagai baku internal adalah (Gandjar & Rohman, 2007) :

- 1) Terpisah dengan baik dari senyawa yang dituju atau puncak-puncak yang lain.
- 2) Mempunyai waktu retensi yang hampir sama dengan analit.
- 3) Tidak terdapat dalam sampel.
- 4) Memiliki kemiripan sifat-sifat dengan analit dalam tahapan-tahapan penyiapan sampel.
- 5) Tidak mempunyai kemiripan sifat kimiawi dengan analit.
- 6) Tersedia dalam perdagangan dengan kemurnian yang tinggi.
- 7) Stabil dan tidak reaktif dengan sampel atau dengan fase gerak.
- 8) Mempunyai respon detector yang hampir sama dengan analit pada konsentrasi yang digunakan.

2.2.4.5.3 Metode Persentase Tinggi/Lebar Puncak atau Metode Normalisasi Internal

Untuk analisis kuantitatif diasumsikan bahwa lebar atau tinggi puncak (*Peak*) sebanding (*proportional*) dengan kadar/konsentrasi zat yang menghasilkan puncak. Dalam metode yang paling sederhana diukur lebar atau tinggi puncak, yang kemudian dinormalisasi (ini berarti bahwa setiap lebar atau tinggi puncak diekspresikan sebagai suatu persentase dari total). Hasil normalisasi dari lebar atau tinggi puncak memberikan komposisi dari campuran yang dianalisis.

Ada dua masalah dengan pendekatan ini, yaitu : kita harus yakin bahwa kita telah menghitung semua komponen, yang tiap-tiap komponen muncul sebagai suatu puncak yang terpisah pada kromatogram. Komponen-komponen dapat berkoelusi, atau ditahan di dalam kolom, atau terelusi tanpa terdeteksi. Kemudian, kita harus mengasumsi bahwa kita memperoleh respons detektor yang sama untuk setiap komponen. Untuk mengatasi kesulitan ini, maka kalibrasi detektor diperlukan (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.5 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika (Gandjar & Rohman, 2007) :

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu.
- b. Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
- c. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu.
- d. Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analisis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
- e. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.

Pada validasi metode bioanalisis terdapat tiga tipe dan tingkatan validasi, yaitu (Food and Drug Administration (FDA), 2001) :

a. Validasi lengkap (*full validation*)

Validasi lengkap ini sangat penting apabila ingin mengembangkan metode dan mengimplementasikan metode bioanalisis untuk pertama kalinya. Validasi ini penting untuk obat baru dan untuk penentuan metabolitnya.

b. Validasi parsial (*partial validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang sudah divalidasi.

c. Validasi silang (*cross validation*)

Validasi silang dilakukan dengan membandingkan parameter-parameter validasi apabila digunakan dua atau lebih metode bioanalisis untuk mendapatkan data pada studi yang sama atau pada studi yang berbeda. Pada validasi ini digunakan metode validasi yang original sebagai pembanding dan metode bioanalisis lainnya sebagai komparator.

Validasi metode analisis yang dilakukan dalam matriks biologi biasanya disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini digunakan pada studi farmakologi klinis, pengujian bioavailabilitas (BA) dan bioekuivalensi (BE), serta uji farmakokinetika (PK). Metode analisis yang selektif dan sensitive untuk evaluasi obat dan metabolitnya (analit) secara kuantitatif sangat berpengaruh terhadap kesuksesan studi farmakologi pre-klinik dan klinik. Parameter-parameter penting dalam validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas. Pengembangan metode analisis meliputi evaluasi selektivitas, akurasi, presisi, uji perolehan kembali (% *recovery*), kurva kalibrasi, dan stabilitas (Harahap, 2010)

2.2.5.4 Ketepatan (Akurasi)

Akurasi menggambarkan kedekatan rata-rata hasil pengujian dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi ditentukan oleh analisis berulang dari sampel yang mengandung analit dalam jumlah yang diketahui. Akurasi dilakukan minimal lima kali pengukuran untuk setiap konsentrasi. Minimal dari tiga konsentrasi di dalam rentang konsentrasi yang direkomendasikan, yaitu pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai rata-rata berada pada 15% nilai sebenarnya, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh memenuhi 20%. Perbedaan nilai rata-rata dan nilai yang sebenarnya menentukan akurasi (FDA *et al.*, 2001); Harahap, 2010).

2.2.5.1 Presisi

Presisi menggambarkan kedekatan hasil pengukuran individual analit yang satu dengan yang lainnya. Presisi diukur menggunakan sedikitnya lima kali pengukuran untuk setiap konsentrasi dan menggunakan minimal tiga konsentrasi yaitu rendah, sedang, tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Pengukuran presisi pada setiap level konsentrasi, harus memiliki nilai koefisien variasi (KV) tidak lebih dari 15%, kecuali LLOQ dimana nilai KV tidak boleh lebih dari 20% (FDA *et al.*, 2001); Harahap, 2010).

2.2.5.2 Perolehan kembali (% Recovery)

Uji perolehan kembali (% *Recovery*) merupakan pengujian respon detector yang diperoleh dari sejumlah analit yang ditambahkan dan diekstraksi dari matriks biologi, dibandingkan dengan respon detector yang diperoleh dari konsentrasi yang sebenarnya dari standar murni. Perolehan kembali dari analit tidak perlu 100% tetapi perolehan kembali

dari analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan reproduksibel. Uji perolehan kembali harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dari sampel yang diekstraksi pada tiga konsentrasi (rendah, sedang, dan tinggi) dengan standar yang tidak diekstraksi yang mewakili perolehan kembali 100% (FDA *et al.*, 2001).

2.2.5.3 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrument dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus terdiri dari 1 sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), 1 sampel *zero* (matriks dengan baku dalam) dan 6-8 sampel *non-zero* yang mencakup kisaran konsentrasi pengukuran (termasuk konsentrasi pada LLOQ).

Kurva kalibrasi dapat diterima jika memenuhi persyaratan berikut : 20% simpangan dari nilai LLOQ, 15% simpangan dari standar selain LLOQ dan setidaknya empat dari enam sampel non zero memenuhi persyaratan tersebut, termasuk LLOQ dan konsentrasi tinggi pada kurva kalibrasi.

2.2.5.3.1 Linearitas

Linearitas suatu metode bioanalisis harus diuji untuk mengetahui adanya hubungan yang linear antara kadar zat dengan respon detector. Linearitas diperoleh dari koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linear yang didapat dari kurva kalibrasi. Dengan dilakukan uji ini, maka dapat diketahui batas-batas konsentrasi dari analit yang memberikan respon detector yang linear. Analisis harus dilakukan pada konsentrasi yang termasuk batas-batas linear dari konsentrasi yang telah dilakukan (Harahap, 2010).

2.2.5.3.2 Batas Deteksi (*limit of detection*, LOD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$).

ICH menggunakan 2 metode pilihan untuk menentukan LOD yakni : metode non instrumental visual dimana pada teknik kromatografi lapis tipis dan metode titrimetric. Kemudian metode perhitungan berdasarkan pada standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*, S) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus, $LOD = 3 (SD/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi (Gandjar & Rohman, 2007).

2.2.5.3.3 Batas Kuantifikasi (*limit of quantification*, LOQ)

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. ICH menggunakan 2 metode untuk menentukan LOQ yaitu : metode non instrumental visual dan metode perhitungan berdasarkan pada standar deviasi respon (SD) dan kemiringan (*slope*, S) kurva baku sesuai dengan rumus, $LOQ = 10 (SD/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi

blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi (Gandjar & Rohman, 2007).

Batas kuantifikasi terendah (*Lower limit of quantification*, LLOQ) adalah analit terkecil yang dapat ditentukan dengan ketelitian dan akurasi tertentu (Harahap, 2010). Standar terendah pada kurva kalibrasi harus diterima sebagai LLOQ jika : respon analit pada LLOQ minimal lima kali respon sampel blanko dan puncak analit dapat diidentifikasi, tidak ada gangguan, reproduibel dengan presisi 20% dan akurasi 80-120% (FDA *et al.*, 2001).

2.2.5.4 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan metode analisis untuk membedakan dan mengukur kadar analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (cairan biologis). Pada uji selektivitas pada sampel blanko matriks biologi yang sesuai dilakukan pada 6 blanko dari sumber yang berbeda. Setiap sampel blanko sebaiknya diuji terhadap adanya gangguan atau interferensi dan selektivitas pada *lower limit of quantification* (LLOQ) (FDA *et al.*, 2001).

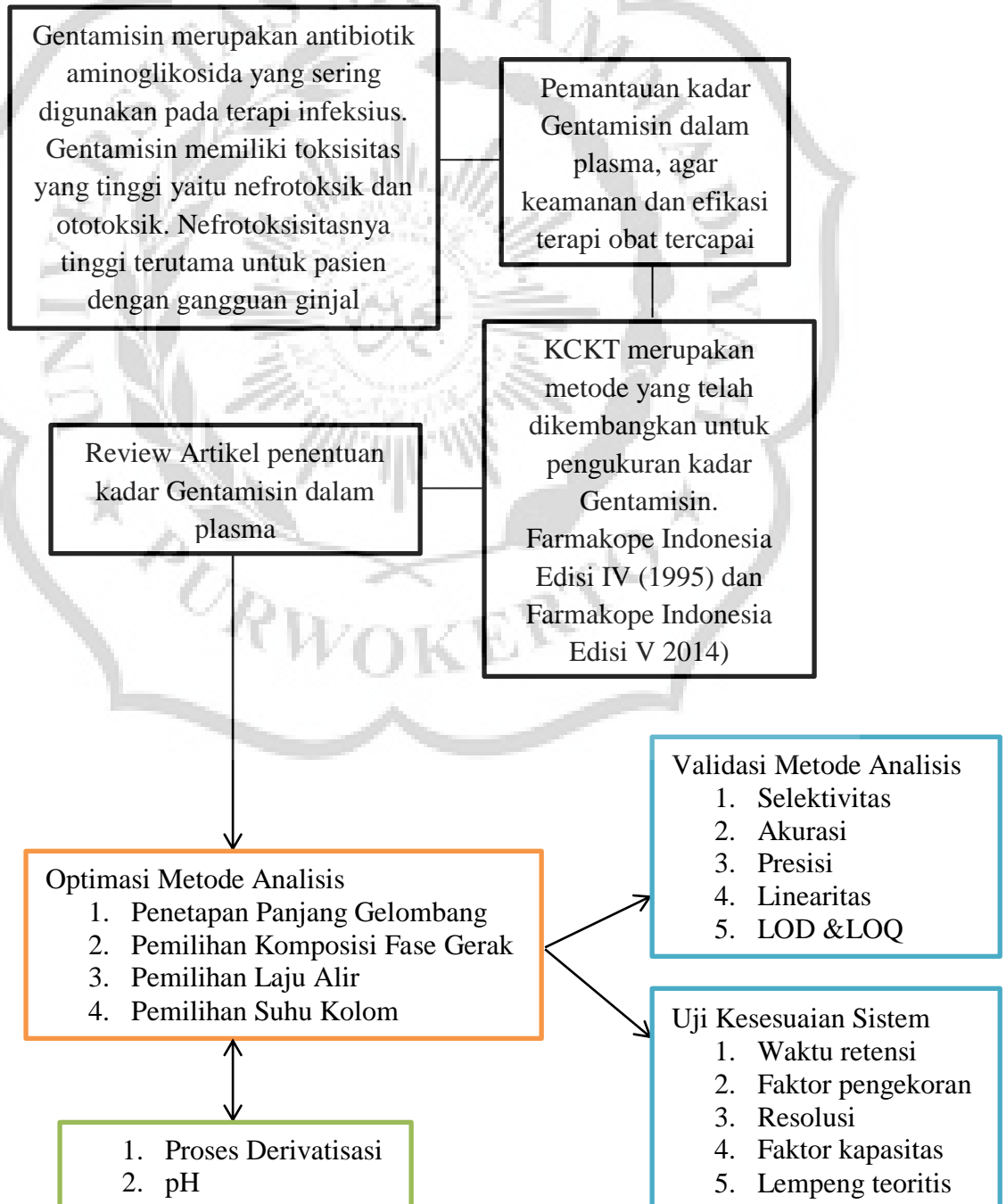
2.2.5.5 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian system didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Seorang analisis harus memastikan bahwa system dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima.

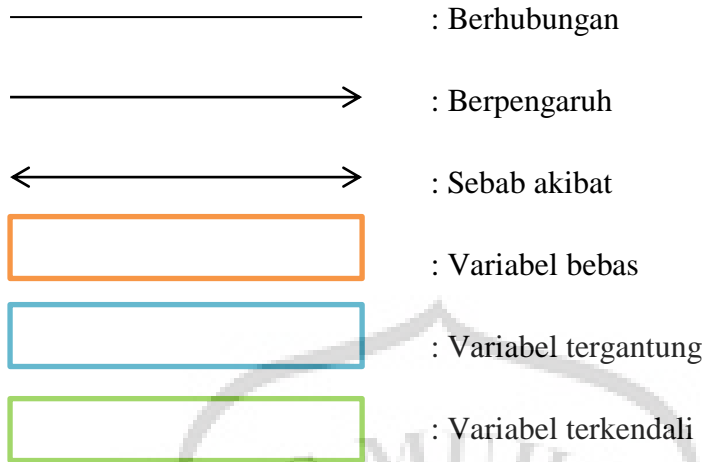
United State Pharmacopeia (USP) menentukan parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian system sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi : bilangan lempeng teori (N), factor *tailing*, kapasitas

(k' atau α) dan nilai standar deviasi relative (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Pada umumnya ada 2 kriteria yang biasanya dipersyaratkan untuk kesesuaian system suatu metode yaitu jika nilai RSD < 1% untuk 5 kali injeksi larutan baku pada pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) dan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika antara 5-15% (Gandjar & Rohman, 2007).

2.3 Kerangka Konsep



Keterangan :



Gambar 2.2 Kerangka konsep

2.4 Hipotesis

Metode penentuan kadar Gentamisin dalam plasma menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dapat menghasilkan pemisahan Gentamisin dalam sampel plasma dengan baik dan memenuhi parameter validasi: selektivitas, akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ (Harmita, 2004).