

MODUL I
ANALISIS BIOEKIVALEN (BE) IN VITRO:
UJI DISOLUSI TERBANDING

1.1. Tujuan Percobaan

Mempelajari perbedaan profil disolusi berbagai obat generik yang sudah beredar dan membandingkan kemiripan (Bioekivalen/BE) antar obat generik tersebut dengan inovator.

1.2. Teori

Produk obat yang beredar di Indonesia terdiri atas produk obat paten, produk dengan nama dagang (bermerek), dan generik berlogo. Obat generik merupakan salah satu alternatif pilihan bagi masyarakat karena harganya lebih murah dibandingkan harga obat dengan nama dagang. Hal ini disebabkan karena adanya penekanan pada biaya produksi dan promosi.

Perbedaan tersebut telah banyak dipelajari sebagai bagian dari ketersediaan hayati obat (*drug bioavailability*) sehingga kini berkembang untuk menjaga kualitas obat perlu adanya kesamaan profil ketersediaan hayati (*bioavailability profile/BA profile*) antar obat generik yang disebut bioekivalen/BE (*bioequivalence atau biowaiver*). Obat dengan kemiripan profil bioavailabilitas diharapkan akan memberikan khasiat dan efikasi yang sama terhadap konsumen. Untuk beberapa obat dengan tingkat kelarutan dan permeabilitas yang baik dalam penentuan BE-nya dapat dilakukan hanya melalui studi *in vitro*. Obat tersebut biasanya memiliki korelasi *in vitro – in vivo* (*in vitro – in vivo correlation/IVIVC*) yang baik.

Uji bioekivalensi adalah uji bioavailabilitas komparatif yang dirancang untuk menunjukkan bioekivalensi antar produk uji dengan produk obat pembanding. Uji ini diperlukan karena metode fabrikasi dan formulasi dapat mempengaruhi bioavailabilitas produk-produk obat tersebut.

Bioavailabilitas adalah jumlah dan kecepatan zat aktif dalam suatu produk obat yang mencapai/tersedia dalam sirkulasi sistemik dalam bentuk utuh atau aktif setelah pemberian produk obat tersebut, diukur dari kadarnya dalam darah terhadap waktu atau dari ekskresinya dalam urin. Dua produk disebut bioekivalen jika mempunyai ekivalensi farmasetik (mengandung zat aktif yang sama) atau merupakan alternatif farmasetik (mengandung zat aktif yang sama tetapi berbeda dalam bentuk sediaan atau kekuatan) dan pada pemberian dengan dosis molar yang sama akan menghasilkan bioavailabilitas yang sebanding sehingga efeknya akan sama, baik dalam hal efikasi maupun keamanan.

Uji bioekivalensi *in vivo* dilakukan pada subyek manusia. Protokol uji harus lolos kaji etik terlebih dahulu sebelum uji dapat dimulai. Sebelum dilakukan uji bioekivalensi *in vivo* terlebih dahulu dilakukan uji ekivalensi *in vitro*. Uji ekivalensi *in vitro* dilakukan dengan uji disolusi terbanding, sebagai uji pendahuluan untuk memprediksi bioavailabilitas dan bioekivalensi produk obat.

Obat generik dibandingkan dengan obat innovator sebagai referensi. Kemiripan antar obat dihitung secara statistik dengan faktor similaritas berikut:

$$f_2 = 50 \cdot \log \{ [1 + (1/n) \sum (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \cdot 100 \}$$

dan faktor perbedaan berikut:

$$f_1 = \{ [\sum (n|R_t - T_t)] / [\sum nR_t] \} \cdot 100$$

dengan R_t = persentase kumulatif obat yang larut pada setiap waktu sampling dari produk pembanding (R = reference), dan T_t = persentase kumulatif obat yang larut pada setiap waktu sampling dari produk uji (T = test). Nilai f_2 sama dengan 50 atau lebih besar (50-100) dan nilai f_1 lebih kecil dari 15 menunjukkan kesamaan atau ekivalensi kedua kurva yang berarti kemiripan profil disolusi kedua produk.

Kondisi pengujian dilakukan untuk masing-masing obat baik innovator maupun uji sebanyak 12 buah tablet. Profil dapat dinyatakan BE bila faktor perbedaan mendekati nilai 0 dan faktor similaritas mendekati 100. Pada umumnya dapat pula dinyatakan BE bila faktor perbedaan memiliki nilai rentang 0 – 15 dan faktor similaritas memiliki rentang 50 – 100.

Prosedur tersebut dapat dilakukan bila kondisi hasil pengujian disolusi kedua produk memberikan jumlah terlarut tidak > 85% dalam waktu 15 menit karena dengan profil tadi tidak diperlukan uji BE lagi.

1.3. Metode Percobaan

1.3.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat disolusi tipe II dan spektrofotometer Uv-Vis. Bahan yang digunakan adalah parasetamol dari beberapa merk (innovator: panadol, obat uji: sanmol, pamol, atau merk lain dengan kandungan yang sama), larutan dapar pH 1,2 atau 0.1 N HCl, dapar asetat pH 4.5, dan dapar fosfat pH 6.8.

1.3.2. Prosedur

Buat sebanyak 900 ml masing-masing medium larutan dapar pH 1.2 atau 0.1 N HCl, dapar asetat pH 4.5, dan dapar fosfat pH 6.8 sesuai pedoman farmakope ed.IV atau USP ed.34. Siapkan alat disolusi dan pastikan waterbath dalam alat disolusi telah

mencapai $37^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Lakukan pengujian dengan masing-masing medium disolusi dengan selang waktu yang sama (5, 10, 15, 20, 25 dan 30 menit).

1.3.3. Evaluasi data

Dibuat grafik hubungan jumlah obat yang terdisolusi terhadap fungsi waktu. Hitung kadar larutan dari sampel yang diambil berdasarkan kurva baku yang telah diperoleh. Interpolasikan data ke dalam persamaan faktor similaritas dan faktor perbedaan

**DATA PERCOBAAN
DISOLUSI TERBANDING**

Nama bahan obat : Inovator.....

Uji.....

Medium :.....

pH :.....

Volume :.....

Alat tipe :.....

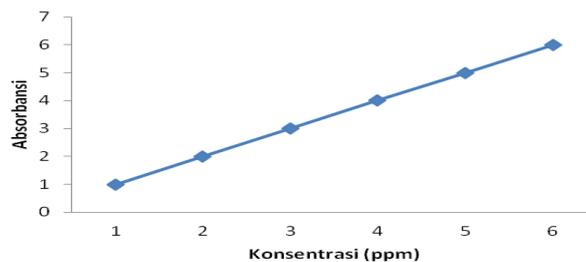
Kecepatan :.....putaran per menit

Percobaan dilakukan pada λ maks = nm

Pembuatan kurva baku

| Seri | Konsentrasi (ppm) | Absorbansi |
|------|-------------------|------------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |

Kurva Baku



Data penentuan kadar secara spektrofotometrik

| Waktu (menit) | A (serapan) | | Faktor Pengenceran |
|---------------|-------------|-----|--------------------|
| | Inovator | Uji | |

Volume sampel tiap kali pengambilan : ml

MODUL 2

UJI BIOAVAIBILITAS DAN BIOEKIVALENSI

2.1. Tujuan Percobaan

Menentukan status bioekivalensi dari suatu produk obat yang diuji dan merancang penelitian uji bioavaibilitas dan bioekivalensi suatu produk obat.

2.2. Teori

Beberapa obat dibuat dan dipasarkan oleh lebih dari satu industri farmasi. Setiap produk yang akan beredar di pasaran harus terjamin kualitasnya sehingga dengan pemakaian produk tersebut efek terapeutik yang diinginkan akan tercapai. Produk generic atau “me too” yang akan dipasarkan juga tidak lepas dari persyaratan ini. Suatu produk generic atau “me too” harus memenuhi standar yang sama dengan produk innovator dalam hal kualitas, efikasi, dan keamanan. Selain evaluasi *in vitro*, evaluasi bioekivalensi *in vivo* perlu pula dilakukan untuk menjamin bioavaibilitas produk generic atau “me too” tidak berbeda berarti (statistical insignificant) dari suatu produk pembanding. Pada umumnya yang dijadikan sebagai produk pembanding adalah produk innovator yang terlebih dahulu menetapkan persetujuan dari pihak berwenang untuk dipasarkan. Diperolehnya status bioekivalen dari suatu produk diharapkan respon efek dan keamanan yang sama dengan produk pembanding. Hal ini akan memberikan kesempatan kepada para dokter maupun pasien untuk memilih berbagai merk obat dengan jaminan bahwa setiap produk akan memberikan efek klinis dan keamanan sebanding.

Uji bioekivalensi menjadi sangat penting pada saat mana masa paten suatu produk innovator habis. Selain itu uji bioekivalensi juga dilakukan pada periode pengembangan suatu produk, adanya perubahan metode atau tempat manufaktur, adanya pergantian peralatan manufaktur, ataupun adanya perubahan sumber bahan baku yang digunakan.

Parameter farmakokinetik yang digunakan untuk evaluasi status bioekivalen suatu produk adalah:

1. AUC (area under curve of concentration-time relationship, luas area di bawah kurva hubungan konsentrasi dan waktu)
2. Cmaks (konsentrasi maksimum)
3. Tmaks (waktu untuk mencapai konsentrasi maksimum)

Dalam praktek, Cmaks dan Tmaks diperoleh dari konsentrasi maksimum hasil pengukuran konsentrasi dalam sampel yang diperoleh dan waktu tercapainya konsentrasi maksimum tersebut. Perlu diperhatikan dalam penetapan Tmaks bahwa pada daerah puncak kurva hubungan konsentrasi dan waktu profil kurva relative mendatar sehingga dengan adanya variabilitas metode penetapan kadar yang digunakan maka nilai Tmaks yang diperoleh mungkin bukan merupakan Tmaks yang sebenarnya. Tidak optimalnya frekuensi pengambilan sampel dapat menyebabkan penetapan nilai Tmaks yang tidak akurat.

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam penelitian bioekivalensi agar hasil yang diperoleh dapat digunakan antara lain adalah:

1. Subyek, yang meliputi penetapan kriteria inklusi dan eksklusi pada saat seleksi subyek penelitian, perlakuan awal yang perlu dilakukan terhadap subyek sebelum uji bioekivalensi dilaksanakan
2. Rancangan, antara lain berapa jumlah subyek yang akan digunakan, jenis kelamin, dan rancangan penelitian.
3. Perlakuan yang akan diberikan yang meliputi dosis obat yang digunakan, caara pemberian, rancangan pengambilan sampel seperti sampel apa yang akan dikumpulkan (darah, plasma, atau urin) dalam waktu pengambilan sampel. Evaluasi hasil yang diperoleh, anatar lain uji statistik yang akan digunakan dan penetapan definisi dari bioekivalen sebelum uji dimulai.

Bioavaibilitas Relatif

Bioavaibilitas relative adalah ketersediaan dalam sistemik suatu produk obat dibandingkan terhadap suatu standar yang diketahui. Bioavaibilitas relative dari dua produk yang diberikan pada rute pemberian yang sama dapat diperoleh dengan persamaan:

$$\text{Bioavaibilitas Relatif (Frel)} = \frac{[AUC_{uji}]}{[AUC_{std}]} \times \frac{\text{Dosis std}}{\text{Dosis uji}} \times 100\% \text{ (Data darah)}$$

$$\text{Bioavaibilitas Relatif (Frel)} = \frac{[Q_{uji}]}{[Q_{std}]} \times \frac{\text{Dosis std}}{\text{Dosis uji}} \times 100\% \text{ (Data urin)}$$

Bioavaibilitas Absolut

Bioavailabilitas absolute suatu obat dapat diukur dengan membandingkan AUC produk yang bersangkutan setelah pemberian oral dan intravena. Persamaan bioavailabilitas absolute dari data darah:

$$\text{Bioavailabilitas absolut (Fabs)} = \frac{[AUC_{uji}]}{[AUC_{iv}]} \times \frac{\text{Dosis iv}}{\text{Dosis uji}} \times 100\%$$

2.3. Metode Percobaan

2.3.1. Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah komputer atau laptop dengan menggunakan program excel.

2.3.2. Prosedur

- A. Susun data AUC dari masing-masing obat yang telah diuji. Tentukan obat yang akan dijadikan sebagai standar.
- B. Hitung Frel dan Fabs
- C. Simpulkan status bioekivalensi dari produk yang diuji

2.3.3. Data Percobaan

- A. Hitunglah bioavailabilitas (F) suatu sediaan obat (Merk A, B, C, D) berupa suspensi oral (konsentrasi zat aktif 50 mg/ml) apabila dibandingkan dengan sediaan injeksi intravena (konsentrasi zat aktif 100 mg/ml) di mana dosis yang diberikan untuk suspensi oral adalah 2 sendok teh, sedangkan dosis injeksi 2 ml. data kadar obat dalam plasma terhadap waktu adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1. Kadar Obat Merk A

| Waktu (Jam) | Kadar ($\mu\text{g/ml}$) | |
|----------------|----------------------------|------|
| | Oral | Iv |
| 0.5 | 2.75 | 5.31 |
| 1 | 6.24 | 4.62 |
| 1.5 | 8.5 | 4.02 |
| 2 | 9.81 | 3.5 |
| 3 | 7.43 | 2.65 |
| 4 | 5.6 | 2.01 |
| 6 | 3.19 | 1.16 |
| 8 | 1.91 | 0.66 |

Tabel 2.2. Kadar Obat Merk B

| Waktu (Jam) | Kadar ($\mu\text{g/ml}$) | |
|----------------|----------------------------|------|
| | Oral | Iv |
| 1 | 2.75 | 5.31 |
| 2 | 6.24 | 4.62 |
| 3 | 8.5 | 4.02 |
| 4 | 9.81 | 3.5 |
| 5 | 7.43 | 2.65 |
| 6 | 5.6 | 2.01 |
| 7 | 3.19 | 1.16 |
| 8 | 1.91 | 0.66 |

Tabel 2.3. Kadar Obat Merk C

| Waktu (Jam) | Kadar ($\mu\text{g/ml}$) | |
|----------------|----------------------------|------|
| | Oral | Iv |
| 0.5 | 3.24 | 5.31 |
| 1 | 6.5 | 4.62 |
| 1.5 | 9.5 | 4.02 |
| 2 | 10.04 | 3.5 |
| 3 | 7.03 | 2.65 |
| 4 | 4.6 | 2.01 |
| 6 | 2.19 | 1.16 |
| 8 | 1.11 | 0.66 |

Tabel 2.4. Kadar Obat Merk D

| Waktu | Kadar ($\mu\text{g/ml}$) | |
|-------|----------------------------|------|
| | Oral | Iv |
| 0.5 | 2.75 | 6.31 |
| 1 | 6.24 | 5.62 |
| 1.5 | 8.5 | 4.52 |
| 2 | 9.81 | 3.56 |
| 3 | 7.43 | 2.75 |
| 4 | 5.6 | 1.88 |
| 6 | 3.19 | 0.96 |
| 8 | 1.91 | 0.46 |

- B. Nyatakan status bioekivalensi dari ketiga sediaan kapsul uji (A, B, C, D) terhadap sediaan standar (STD) dengan data sebagai berikut:

Tabel 2.5. Data AUC Sediaan Kapsul

| Sukarelawan | AUC ($\mu\text{g/ml.jam}$) |
|-------------|------------------------------|
|-------------|------------------------------|

| | A | B | C | D | STD |
|---|------|------|-------|------|------|
| 1 | 14.1 | 19.1 | 18.7 | 9.6 | 15.8 |
| 2 | 20.2 | 20 | 17.8 | 10.6 | 19 |
| 3 | 19 | 17.5 | 19.98 | 14.6 | 19.3 |
| 4 | 13.2 | 20.3 | 15.88 | 13.1 | 18.4 |
| 5 | 13.5 | 17.3 | 17.89 | 10.4 | 17.2 |
| 6 | 17.9 | 17.4 | 19.99 | 8.3 | 16.5 |
| 7 | 12.4 | 17.2 | 14.56 | 14.5 | 17.9 |
| 8 | 15.8 | 16.9 | 10.7 | 11.4 | 17.5 |

- C. Sebutkan dan jelaskan secara lengkap faktor-faktor yang mempengaruhi ketersediaan hayati suatu obat.

MODUL 3

DISOLUSI INTRINSIK DAN PARTIKULAT

3.1. Tujuan Percobaan

Mempelajari pengaruh keadaan bahan (baku) obat (polimorfi, hidrat, solvat) terhadap kecepatan disolusi intrinsik dan partikulatnya sebagai preformulasi untuk bentuk sediaannya.

3.2. Teori

Telah banyak publikasi yang menyatakan adanya hubungan yang bermakna antara kecepatan disolusi berbagai bahan obat dari sediaannya dan absorpsinya. Obat-obat tersebut umumnya meliputi obat-obat yang kecepatan disolusinya sangat lambat yang disebabkan oleh kelarutannya yang sangat kecil. Obat-obat yang memiliki kecepatan disolusi intrinsiknya kurang dari 0,1 mg menit⁻¹ cm⁻² biasanya menimbulkan masalah serius pada absorpsinya, sedangkan obat-obat yang memiliki kecepatan disolusi intrinsik lebih besar dari 1,0 mg menit⁻¹ cm⁻², pada umumnya kecepatan disolusi bukan menjadi langkah penentu, tetapi kecepatan absorpsinya (Kaplan, 1973).

Studi kecepatan disolusi intrinsik sudah diawali sejak tahun 1987 oleh Noyes dan Whitney dengan menggunakan bahan asam benzoat dan timbal klorida, yang kemudian diperoleh persamaan Noyes-Whitney sbb:

$$\frac{dC}{dt} = K \cdot S \cdot (C_s - C) \quad (1)$$

dengan dC/dt = kecepatan disolusi bahan obat

K = tetapan kecepatan disolusi

S = luas permukaan bahan obat yang berdisolusi

Cs = kelarutan bahan obat yang berdisolusi

C = kadar bahan obat yang terlarut dalam cairan medium

Persamaan (1) memperlihatkan bahwa kecepatan disolusi berbanding lurus dengan luas permukaan bahan obat dan kelarutannya. Persamaan ini sebenarnya merupakan turunan dari persamaan Fick pertama, yang secara matematis dinyatakan dengan :

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2)$$

dengan J = fluks bahan obat, yaitu jumlah bahan obat yang lewat per satuan waktu melalui suatu satuan luas dengan arah tegak lurus ($\text{mg cm}^{-2}\text{det}^{-1}$)

D = koefisien distribusi

$\frac{\partial C}{\partial x}$ = gradient kadar

Pada jarak (x) = h cm dan permukaan bahan obat yang terdisolusi, akan berlaku persamaan :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{C - Cs}{h} \quad (3)$$

Jika persamaan (3) dimasukkan ke dalam persamaan (2) diperoleh persamaan :

$$J = - \frac{D(C - Cs)}{h} \quad (4)$$

Selanjutnya persamaan (4) dapat diubah menjadi :

$$\frac{dm}{dtS} = \frac{D(Cs - C)}{h} \quad (5)$$

$$\frac{dm}{dt} = \frac{V \cdot dC}{dt} = \frac{D \cdot S(Cs - C)}{h} \quad (6)$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D(Cs - C)}{V \cdot h \cdot K} \quad (7)$$

Pada persamaan (7), jika $D/V \cdot h$ diganti dengan K (karena masing-masing merupakan tetapan), maka hasilnya akan identik dengan persamaan (1).

3.3. Metode Percobaan

3.3.1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, alat-alat gelas, tabung disolusi, thermostat dengan penangas air, penyangga (holder) sampel (berupa pellet), motor pemutar, stopwatch, spektrofotometer UV

Bahan-bahan yang digunakan adalah pellet bahan obat/serbuk bahan obat (misalnya kloramfenikol palmitat polimorfi A dan B), lilin cair, dan medium disolusi

3.3.2. Prosedur

A. Disolusi intrinsik

Untuk disolusi intrinsik, *pellet* bentuk tablet (dibuat dengan mencetak kira-kira 300 mg bahan obat dengan tekanan 5 ton selama 5 menit), ditaruh pada pada penyangga, lalu bagian atas pellet dituangi lilin cair, sehingga hanya satu permukaan pellet yang terbuka, yang langsung dapat bersinggungan dengan medium disolusi. Diagram alat disolusi ini dapat dilihat pada gambar 3.1. Peyangga yang sudah berisi sampel ini lalu ditutup dan dihubungkan dengan motor pemutar.

Tabung percobaan yang telah diisi 150 ml medium disolusi, suhunya diatur dengan thermostat pada $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pellet yang sudah dipasang pada penyangga diselupkan dalam medium disolusi, diatur agar tidak ada gelembung udara di bawahnya, lalu dipasang pada motor pemutar dan segera diputar dengan kecepatan 100 putaran per menit. Jarak antara permukaan pellet dengan dasar tabung disolusi 2 cm.

Sampel hasil disolusi diambil tiap selang waktu tertentu (menit ke-5, 10, 20, 30, 45, dan 60). Selanjutnya sampel yang diperoleh ditentukan kadarnya secara spektrofotometrik.

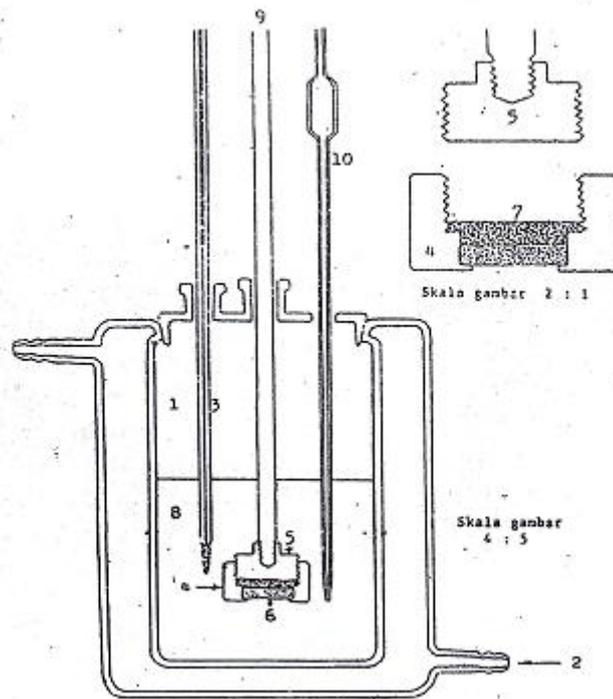
B. Disolusi Partikulat

Untuk disolusi partikulat, serbuk obat langsung dimasukkan ke dalam medium disolusi. Tabung percobaan yang telah diisi 150 ml medium disolusi, suhunya diatur dengan thermostat pada $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Dayung diputar dengan kecepatan 100 putaran per menit. Jarak antara permukaan bawah dayung dengan dasar tabung disolusi 2 cm.

Sampel hasil disolusi diambil tiap selang waktu tertentu (menit ke-5, 10, 20, 30, 45, dan 60). Selanjutnya sampel yang diperoleh ditentukan kadarnya secara spektrofotometrik.

3.3.3. Evaluasi data

- A. Dibuat grafik hubungan jumlah obat yang terdisolusi sebagai fungsi waktu setelah dikoreksi karena adanya pengurangan kadar larutan oleh sampel yang diambil kecepatan disolusi dihitung dan diekspresikan dalam DE_{60} atau tetapan k_{Wagner} .
- B. Kecepatan disolusi intrinsik masing-masing sampel tiap waktu pengambilan sampel dihitung dan disusun dalam suatu table, menurut data kecepatan pelarutan.



Gambar 3.1. Bagian alat untuk percobaan kecepatan pelarutan, 1-Tabung percobaan yang dilengkapi jaket pengatur temperature. 2 – Aliran air dari thermostat. 3 – Termometer. 4 – Penyangga. 5 – Tutup Peyangga. 6 – Tablet. 7 – Lilin. 8 – Cairan pelarut. 9 – Motor Pemutar. 10 – Pipet volume.

DATA PERCOBAAN

DISOLUSI INTRINSIK DAN PARTIKULAT

Nama bahan obat :

Diameter pellet :cm ; Bobot pellet:

Medium disolusi :

pH : Volume : ml

Kecepatan : Putaran per menit

MODUL 4

ABSORPSI OBAT PER ORAL SECARA *IN VITRO*

4.1. Tujuan

Mempelajari pengaruh pH terhadap absorpsi obat melalui saluran pencernaan secara *in vitro*

4.2. Teori

Obat pada umumnya diabsorpsi dari saluran pencernaan secara pasif. Absorpsi obat adalah suatu proses pergerakan obat dari tempat pemberian ke dalam sirkulasi umum dalam tubuh. Absorpsi obat dari saluran pencernaan ke dalam darah umumnya terjadi setelah obat tersebut larut dalam cairan di sekeliling membrane tempat terjadinya absorpsi. Obat-obat yang ditranspor secara difusi pasif hanyalah yang larut dalam lipida. Makin baik kelarutannya dalam lipida makin baik absorpsinya, sampai suatu absorpsi optimal tercapai.

Sebagian besar obat merupakan asam atau basa organik lemah. Absorpsi obat dipengaruhi oleh derajat ionisasinya pada waktu zat tersebut berhadapan dengan membrane. Membrane sel lebih permeable terhadap bentuk obat yang tidak terionkan daripada bentuk terionkan. Derajat ionisasi tergantung pada pH larutan dan pKa obat seperti terlihat pada persamaan Henderson-Hasselbalch sebagai berikut :

Untuk suatu asam

$$pH = pKa + \log \frac{\text{fraksi obat yang terionkan}}{\text{fraksi obat yang tak terionkan}}$$

Untuk suatu basa

$$pH = pKa - \log \frac{\text{fraksi obat yang terionkan}}{\text{fraksi obat yang tak terionkan}}$$

Dengan menyusun kembali persamaan untuk asam :

$$\log \frac{\text{fraksi obat yang terionkan}}{\text{fraksi obat yang tak terionkan}} = pKa - pH$$

Maka seseorang dapat secara teoritis menentukan jumlah relative dari suatu obat dalam bentuk tidak terionkan pada berbagai kondisi pH.

Untuk obat yang ditranspor secara difusi pasif, peranan dinding usus hanya sebagai membran difusi. Studi absorpsi *in vitro* dimaksudkan untuk memperoleh informasi tentang mekanisme absorpsi suatu bahan obat, tempat terjadinya absorpsi yang optimal, permeabilitas

membrane saluran pencernaan terhadap berbagai obat, serta pengaruh berbagai factor terhadap absorpsi suatu obat.

Menurut Turner dkk, permeabilitas membrane biologi terhadap suatu obat dapat digambarkan oleh koefisien partisinya dan mempunyai hubungan linear dengan kecepatan transport atau kecepatan absorpsinya, yang dinyatakan dengan persamaan sebagai berikut :

$$\frac{\delta Qb}{\delta t} = Dm \cdot Am \cdot P_{m/s} (Cg - Cb) \frac{1}{\delta X_m}$$

Dengan $\frac{\delta Qb}{\delta t}$ = kecepatan transport obat ke kompartemen dalam (darah)

Dm = tetapan kecepatan difusi obat melalui membrane

Am = luas membrane yang digunakan untuk berdifusi

$P_{m/s}$ = koefisien partisi obat dalam membrane pelarut

Cg = kadar obat dalam kompartemen luar (usus) pada waktu t

Cb = kadar obat dalam kompartemen dalam (darah) pada waktu t

Untuk obat-obat yang strukturnya tertentu dan tempat absorbsinya sudah tertentu pula, maka kecepatan absorpsinya hanya ditentukan oleh gradient kadar obat di antara kedua permukaan membrane, yang memisahkan lumen saluran pencernaan sengan (plasma) darah, sehingga persamaan di atas dapat disederhanakan menjadi :

$$\frac{\delta Qb}{\delta t} = Pm (Cg - Cb)$$

Dengan : $Pm = Dm \cdot Am \cdot P_{m/s} \frac{1}{\delta X_m}$

Dimana Pm disebut sebagai permeabilitas membrane

Jika Cb , dapat diabaikan karena $Cb \ll Cg$, maka persamaan tersebut dapat disederhanakan menjadi :

$$\frac{\delta Qb}{\delta t} = Pm \cdot Cg$$

Hasil integrasi persamaan ini adalah :

$$Qb = Pm \cdot Cg \cdot t$$

Dengan, Qb = jumlah obat yang ditranspor dari kompartemen luar ke kompartemen dalam, dalam selang waktu t .

Kurva hubungan jumlah obat yang ditranspor sebagai fungsi waktu akan memberikan garis linear dengan angka arah $K = Pm \cdot Cg$ dan *lag time*, yaitu harga perpotongan garis dengan sumbu t .

Bahan obat yang memiliki *lag time* kurang dari 15 menit biasanya tidak menimbulkan masalah pada proses transport melalui membrane biologis.

4.3. Metode Percobaan

4.3.1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Tabung Crane dan Wilson yang dimodifikasi, Spektrofotometer, Water-bath (penangas air), Timbangan analitik, pH meter, alat-alat bedah, dan alat-alat gelas.

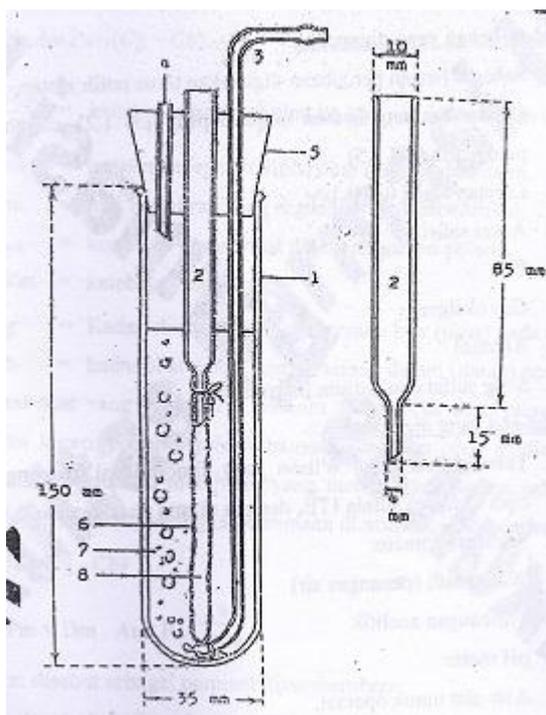
Bahan-bahan yang digunakan adalah hewan percobaan digunakan tikus putih jantan, cairan lambung buatan tanpa pepsin (pH 1,2), airan usus buatan tanpa pankreatin (pH 7,5), Larutan NaCl 0,9 % b/v, Asam salisilat, Eter, Gas oksigen, Alkohol, Seng sulfat dan barium hidroksida.

4.3.2. Prosedur

- A. Penentuan λ maksimum
- B. Pembuatan kurva baku
- C. Penentuan absorpsi pada usus halus tikus

Hewan percobaan dipuasakan selama 20-24 jam, tapi diberi minum air masak. Tikus dibunuh dengan eter, kemudian dibuka perutnya di sepanjang *linea mediana* dan usus dikeluarkan. Usus sepanjang 15 cm dibawah *pylorus* dibuang dan 20 cm dibawahnya dipotong untuk percobaan.

Usus dibagi dua bagian sama panjang, kemudian dibersihkan. Bagian anal digunakan sebagai kontrol. Ujung *anal* dari potongan usus tersebut diikat dengan benang, kemudian dengan menggunakan batang gelas yang berdiameter 2 mm usus tersebut dibalik, sehingga bagian mukosa terletak di luar. Kanula dimasukkan ke ujung *oral* dari usus yang belum terikat.



Gambar 4.1. Bagan alat untuk percobaan absorpsi *in vitro* hasil modifikasi alat Crane dan Wilson.

1 = tabung gelas. 2 = kanula yang dibuat dari gelas. 3 = pipa gelas untuk oksigen. 4 = pipa gelas untuk keluarnya gas. 5 = tutup karet. 6 = usus halus tikus yang dibali. 7 = cairan mukosa. 8 = cairan serosal.

Usus diukur dengan panjang efektif 7 cm yang sebelumnya diisi dengan cairan serosal 1,4 ml yang terdiri dari larutan natrium klorida 0,9 % b/v. Kantong usus yang sudah diisi cairan serosal ini dimasukkan ke dalam tabung yang sudah diisi cairan mukosal 75 ml (yang mengandung bahan obat) pada suhu 37° C. Kantong usus untuk kontrol dilakukan dengan cara yang sama, tetapi dengan menggunakan cairan mukosal tanpa obat.

Selama percobaan berlangsung, seluruh bagian usus dijaga agar dapat terendam dalam cairan mukosal dan selalu dialiri gas oksigen dengan kecepatan kira-kira 100 gelembung per menit.

Pada waktu tertentu kadar obat dalam cairan serosal ditentukan. Untuk penentuan ini seluruh cairan serosal diambil melalui kanula dan segera dicuci dengan larutan 0,9 % b/v natrium klorida, kemudian diisi lagi dengan 1,4 ml larutan 0,9 % b/v natrium klorida.

4.3.3. Cara analisis

Diambil 1 ml sampel kemudian ditambah dengan 2 ml larutan sengsulfat 5 % dan 2 ml barium hidroksida 0,3 N. larutan dikocok dan dipusingkan selama 5 menit. Ambil bagian yang jernih, kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum.

Catatan : Cairan mucosal terdiri dari : 0,01 M asam salisilat dalam cairan labung buatan tanpa pepsin (pH 1,2) dan dalam cairan usus buatan tanpa pankreatin (pH 7,5).

Cairan serosal terdiri dari 1,4 ml larutan 0,9 % b/v natrium klorida.

4.3.4. Evaluasi data

- A. Dibuat grafik hubungan antara jumlah dan kadar obat yang ditranspor sebagai fungsi waktu
- B. Dihitung P_m (permeabilitas) dan *lag time*
- C. Dihitung K_a (tetapan kecepatan absorpsi)
- D. Bandingkan parameter di atas pada pH 1,2 dan pH 7,5

MODUL 5

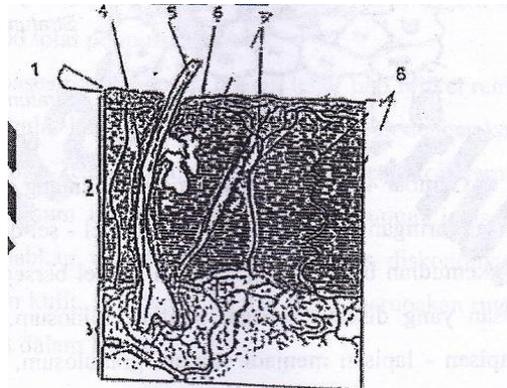
ABSORPSI OBAT PERKUTAN SECARA *IN VITRO*

5.1. Tujuan

Tujuan percobaan ini adalah untuk mempelajari absorpsi obat secara perkutan secara *in vitro*.

5.2. Teori

Berbagai macam cara pemakaian obat telah dikenal, antara lain oral, intravena, intramuscular, intraperitoneal, subkutan, sublingual, rektal dan nasal. Pemakaian obat yang dioleskan pada permukaan kulit sering disebut pengobatan secara topical. Pada obat yang digunakan secara topical, untuk dapat memberikan aksinya obat harus dilepaskan dari pembawa. Selanjutnya, obat dapat berada pada permukaan kulit dan menembus sampai ke dalam epidermis serta mungkin dapat sampai peredaran darah. Penetrasi obat ke dalam kulit ditentukan oleh berbagai faktor, seperti sifat fisikokimia obat dari bahan pembawa. Selain faktor fisikokimia tersebut, faktor kulit juga tidak kalah pentingnya.



Gambar 4.1. Skema penampang melintang kulit

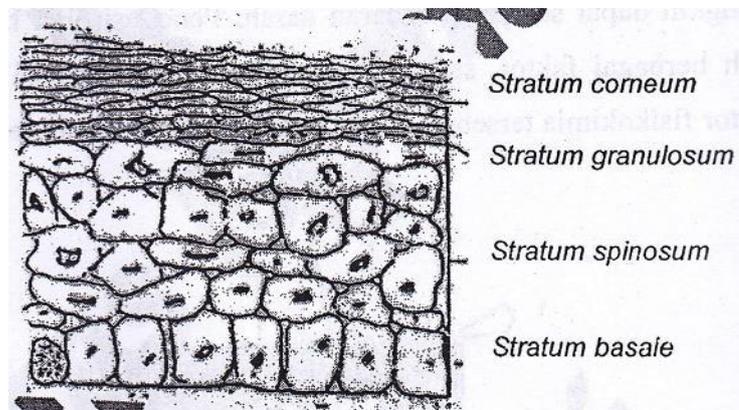
| | | |
|------|----------------------|------------------------|
| Ket: | 1. Epidermis | 7. Pembuluh darah vena |
| | 2. Dermis | 8. Kelenjar keringat |
| | 3. Jaringan subkutan | |
| | 4. Folikel rambut | |
| | 5. Batang rambut | |
| | 6. Kelenjar sebacea | |

Anatomi dan fisiologi kulit

Kulit merupakan organ tubuh terbesar yang tidak hanya berfungsi sebagai pembungkus tubuh dan terdapat syaraf perasa, tetapi kulit berfungsi untuk menjaga tubuh dari pengaruh luar, seperti suhu, tekanan, senyawa kimia, dan menahan masuknya kuman ke dalam

tubuh. Kulit manusia tersusun secara berlapis-lapis dengan struktur dan fungsi yang kompleks. Kulit dapat dibagi, secara umum, menjadi 3 lapis yang berbeda, yaitu epidermis, dermis, dan jaringan subdermis yang berlemak. Gambar 4.1. memperlihatkan penampang melintang kulit.

Epidermis. Epidermis merupakan lapisan terluar kulit yang umumnya berfungsi sebagai penghalang terpenting terhadap hilangnya air, elektrolit, dan/atau nutrient tubuh, serta menahan masuknya senyawa asing dari luar. Gambar 4.2 memperlihatkan penampang melintang epidermis dan terlihat epidermis terdiri dari stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum dan stratum basal (germinativum).

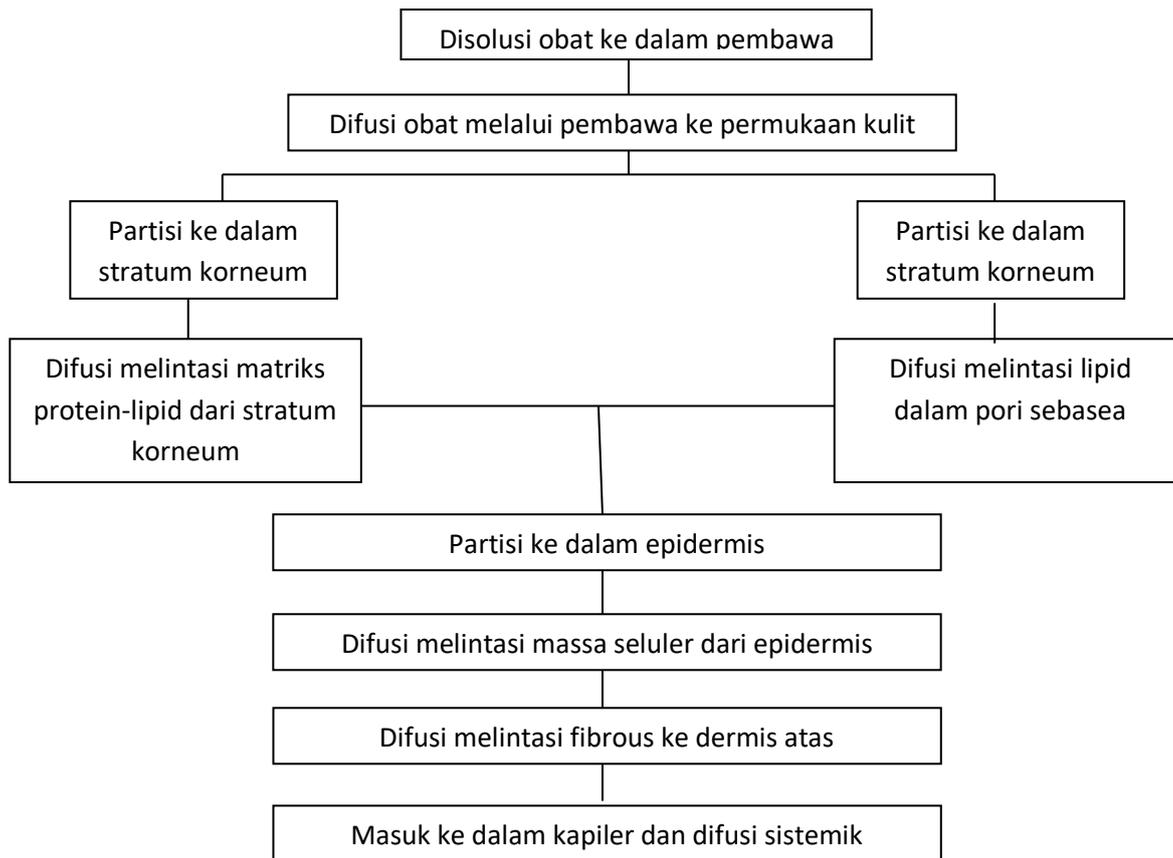


Kehidupan jaringan epidermis dimulai dari sel-sel stratum germinativum ke arah luar yang kemudian berkembang menjadi sel-sel bersegi banyak dan membentuk lapisan-lapisan yang disebut sebagai stratum spinosum. Sel-sel itu ke arah luar membentuk lapisan-lapisan menjadi stratum granulosum. Lapisan terluar epidermis adalah stratum korneum yang terdiri dari sel-sel mati yang rata (*flat*) dan mengandung sekitar 65 % keratin, yaitu suatu protein yang dihasilkan selama proses differensiasi. Sel-sel stratum korneum saling berdempet satu dengan yang lain dan bagian epidermis ini merupakan penghalang yang paling penting kulit terhadap masuknya benda-benda asing. Umumnya, stratum korneum mempunyai 10-15 lapis sel dan ketebalannya dalam keadaan kering sekitar 10 mikrometer, tetapi bila terkena air akan mengembang sampai beberapa kalinya. Sel-sel stratum korneum memiliki bobot jenis 1,5 g/cm³ dengan ketebalan tiap-tiap selnya 0,5 – 1,5 mikrometer. Stratum korneum memegang peranan penting dalam mengontrol absorpsi percutan molekul-molekul obat. Permeabilitas selektif stratum korneum merupakan tema sentral dalam berbagai aspek untuk studi biofarmasetika produk-produk topical.

Dermis. Dermis adalah lapisan kulit yang terletak antara epidermis dan jaringan lemak subkutan. Tebal lapisan ini sekitar 3-5 mm. Dermis ini mengandung lapisan padat dari

serabut protein, seperti kolagen, reticulum dan elastin ayng disimpan dalam substansi dasar amorf dari mukopolisakarida.

Fungsi dermis ini terutama melindungi tubuh dari luka, menjadikan epidermis lebih fleksibel, penghalangterhadap infeksi, dan sebagai organ penyimpanan air. Dalam dermis terdapat pembuluh-pembuluh darah, syaraf, limfatik, kelenjar ekrin, kelenjar apokrin, folikel rambut, dan kelenjat sebacea.



Kelenjar keringat ditemukan di seluruh permukaan tubuh dan mensekresi suatu larutan encer garam, dan beberapa komponen lain (95% keringat berupa air). Keringat mempunyai pH 4,5-5,5. Fungsi utama kelenjar ini utnuak mengontrol panas dan sekresinya dirangsang oleh temperature luar (yang tinggi) dan atau proses dalam tubuh yang menghasilkan panas. Kelenjar keringat merupakan bagian kecil dari permukaan tubuh yaitu 1/10.000 total permukaan tubuh.

Kelenjar sebacea terdapat pada bagian leher tiap folikel rambut dengan diameter 200-2000 µm. kelenjar ini mensekresi material minyak dengan komposisi : trigliderida 57,5%, ester-ester lilin 26%, squalene 12 %, ester-ester kolesterol 3 %, dan kolesterol 1,5 %, komposisi sebum ini bervariasi tergantung umur, jenis kelamin dan bangsa. Sebum ini

menyebabkan terbentuknya lapisan tipis diskontinyu bahan lipofil pada beberapa permukaan kulit, karenanya sebum dapat merupakan rute absorpsi obat untuk obat-obat yang larut dalam lemak.

Absorpsi Perkutan

Absorpsi perkutan dapat didefinisikan sebagai absorpsi obat ke dalam stratum korneum (lapisan tanduk) dan berlanjut obat menembus lapisan dibawahnya serta akhirnya obat masuk dalam sirkulasi darah.

Kulit merupakan perintang yang efektif terhadap penetrasi perkutan obat atau senyawa eksternal. Absorpsi obat perkutan dipengaruhi oleh sifat fisikokimia obat pembawa serta kondisi kulit pada pemakaian obat secara topical, obat berdifusi dalam pembawanya dan kontak dengan permukaan kulit (stratum korneum dan sebum) serta obat selanjutnya menembus epidermis.

Penetrasi obat melalui kulit dapat terjadi dengan 2 cara :

1. Rute transepidermal, yaitu difusi obat menembus stratum korneum
2. Rute transfolikular, yaitu difusi obat melewati pori kelenjar keringat dan sebum.

Gambar 3 memperlihatkan skema absorpsi obat perkutan. Seperti terlihat pada gambar 3, proses absorpsi perkutan terdiri dari tahap-tahap partisi obat ke dalam stratum korneum dan sebum. Rute yang merupakan rute penting adalah rute transepidermal sebab permukaan epidermis mempunyai luas beberapa kali luas dan rute transfolikular

Difusi obat melalui membran

Sebelum obat dapat memberikan efek, obat perlu dilepaskan dari basisnya. Setelah obat kontak dengan stratum korneum maka obat akan menembus epidermis dan masuk ke dalam sirkulasi sistemik secara difusi pasif.

Difusi pasif adalah proses perpindahan massa dari tempat yang berkonsentrasi tinggi ke tempat yang berkonsentrasi rendah. Perbedaan konsentrasi itu merupakan daya dorong (*driving force*) sebagai penyebab terjadinya perpindahan massa. Untuk difusi dengan melewati membrane molekul obat harus masuk dan melarut dulu dalam membrane itu. Selanjutnya, obat berdifusi meninggalkan membrane dan masuk ke dalam medium reseptor.

Difusi pasif mengikuti hukum Fick yaitu teori yang menggambarkan hubungan antara fluks obat melewati membrane sebagai fungsi perbedaan konsentrasi. Persamaan Fick dapat dituliskan sbb :

$$J = (KD/h)(C_s - C)$$

Dengan J = fluks per satuan luas; K = koefisien partisi obat dalam membrane dan pembawa; h = tebal membrane; D = koefisien difusi obat; C_s = konsentrasi obat dalam pembawa ; C = konsentrasi obat dalam medium reseptor.

Bila harga $C_s \gg C$ maka persamaan diatas dapat disederhanakan menjadi :

$$J = (KD/h)C_s$$

Kondisi $C_s \gg C$ sering disebut sebagai kondisi “sink”. Term (KD/h) sering disebut sebagai koefisien permeabilitas (P).

5.3. Metode percobaan

5.3.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah sel difusi tipe horizontal (*side by side*) atau sel difusi tipe vertikal, spektrofotometer. Bahan yang digunakan adalah asam salisilat, membrane Milipore yang diimpregnasi dengan isopropyl miristat (atau kulit tikus).

5.3.2. Prosedur:

A. Penyiapan membrane lipid buatan sebagai membrane difusi :

1. Membran Milipore dipotong bentuk lingkaran seukuran dengan besaran lubang cincin penghubung antara kompartemen donor dan kompartemen aseptor pada sel difusi
2. Impregnasikan membrane tersebut selama lebih kurang 15 menit dalam isopropyl miristat kemudian tempatkan membrane tersebut pada kertas saring untuk menghisap kelebihan lipid selama lebih kurang 5 menit.

B. Penyiapan kulit tikus segar sebagai membrane difusi :

1. Potonglah rambut pada kulit tikus (yang telah dikorbankan) dengan electric clipper secara hati-hati sehingga tidak menggores stratum korneum.
2. Pisahkan kulit bagian dorsal (punggung) dari tubuh tikus dengan hati-hati menggunakan pisau bedah/scalpel/ginting bedah. Jika terdapat lemak subkutan, buanglah dengan scalpel. Potong kulit bagian punggung berbentuk lingkaran sesuai dengan bentuk dan luas kontak sel difusi.

C. Pelaksanaan uji difusi (berlaku untuk membrane kulit buatan maupun kulit tikus)

1. Rendamlah membrane pada larutan dapar fosfat untuk proses hidrasi membrane selama 30 menit.
2. Ambil membrane dan tempatkan diantara kompartemen donor dan aseptor. Untuk mencegah kebocoran tempatkan ring karet atau silicon diantara kompartemen donor dan aseptor.
3. Pasanglah sel difusi dengan mengencangkan mur yang ada sehingga terbentuk suatu sistem sel *side by side* (atau tipe vertikal)
4. Tempatkan larutan donor asam salisilat (konsentrasi 1,5 mg/ml – dalam air) pada kompartemen donor.
5. Jalankan pengasuk magnetic pada kecepatan 120 rpm baik pada sisi donor dan aseptor.
6. Lakukan pengukuran transport obat ke kompartemen aseptor pada rentang waktu 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 menit.
7. Buatlah profil hubungan antara kumulatif transport terhadap waktu dan tentukan flux berdasarkan nilai slope pada daerah linear berdasarkan persamaan berikut :

$$Q(t) = \text{flux} * \text{luas membrane} * \text{waktu}$$

8. Gunakan parameter farmakokinetik asam salisilat sbb: $T_{0,5} = 2,5$ jam, total klirens = 1,38 L/jam (Vree, et al, 1994, Int J Clin Pharmacol Ther) untuk memprediksikan profil kadar obat dalam plasma jika diasumsikan :
 - a) *Lag time* kinetic asam salisilat *in vivo* dapat diabaikan
 - b) Flux asam salisilat dari donor ke aseptor menggambarkan flux asam salisilat dari donor menembus kulit menuju plasma
 - c) Luas area difusi menggambarkan luas kontak antara sediaan transdermal dengan permukaan kulit

Pertanyaan

- a. Mengapa uji *in vitro* perlu dilakukan sebelum melakukan uji secara *in vivo*?
- b. Bagaimanakan kriteria suatu obat agar formulasinya secara transdermal memberikan tingkat transport yang menjanjikan?

DATA PERCOBAAN

ABSORPSI PERKUTAN OBAT SECARA *IN VITRO*

Nama obat :
Bentuk sediaan :
Bahan pembawa :
Bobot sampel :
Obat yang diberikan :
Jenis membrane : buatan / Hewan *
Hewan percobaan :
Bobot hewan :
Luas permukaan kulit :
Persamaan kurva baku :
Harga x dalam mg⁰/M/ :

Absorpsi perkutan :

| Waktu sampling | Serapan | Kadar obat ($\mu\text{g/ml}$) | kadar kumulatif terkoreksi ($\mu\text{g/ml}$) |
|----------------|---------|------------------------------------|--|
|----------------|---------|------------------------------------|--|

*coret yang tidak perlu

MODUL 6
PENGEMBANGAN METODE ANALISIS OBAT
DALAM SAMPEL BIOLOGIS

6.1. Tujuan :

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat :

1. Memahami berbagai metode pengembangan analisis obat dalam sampel biologis beserta validasinya.
2. Mampu melakukan berbagai teknik/metoda analisis obat dalam sampel biologis sesuai dengan tugas yang diberikan.

6.2. Pendahuluan

Tahapan awal dalam penelitian farmakokinetika yang sangat menentukan adalah penetapan kadar obat dalam sampel biologis, karena parameter farmakokinetika obat diperoleh berdasarkan hasil pengukuran kadar obat utuh dan/atau hasil uraian (metabolit) dalam sampel biologis, seperti darah, urin, saliva dan lain-lain. Metode analisis yang digunakan untuk penentuan kuantitatif kadar obat dalam suatu sampel biologis merupakan hal yang sangat penting dalam evaluasi dan interpretasi data farmakokinetika. Oleh karena itu metode analisis yang tervalidasi merupakan suatu kebutuhan mutlak untuk memperoleh hasil yang dapat dipercaya.

Tahap untuk mendapatkan metode analisis yang valid untuk diaplikasikan dalam suatu penelitian farmakokinetik meliputi :

1. Pengembangan metode analisis
2. Validasi metode analisis yang akan digunakan

Dalam tahap pengembangan perlu diperhatikan apakah untuk obat yang akan diteliti belum pernah ada metode analisis untuk penetapan kadar obat tersebut dalam matriks biologi yang akan digunakan. Jika memang belum ada metode analisis yang telah dikembangkan, maka perlu diperhatikan struktur dan sifat fisikokimia obat yang akan diteliti. Apakah ada metode analisis untuk obat lain dengan struktur yang mirip dalam matriks biologi yang sama. Jika ada, data ini merupakan suatu awalan untuk memulai suatu pengembangan metode analisis. Dalam banyak kasus, metode analisis untuk penelitian farmakokinetik dapat diadaptasikan dari satu atau beberapa metode analisis yang telah dipublikasikan dengan melakukan sedikit atau pun berbagai modifikasi untuk mendapatkan hasil yang diinginkan.

Metode analisis yang umum digunakan dalam penelitian farmakokinetika adalah:

1. Metode kimia, contoh : HPLC (*High performance liquid chromatography*), GS (*Gas chromatography*), LC-MS (*Liquid chromatography-mass spectrometry*), GC-MS (*Gas chromatography-mass spectrometry*)
2. Metode biologi, yang didasarkan pada prosedur *immunoassay* (RIA, *radioimmunoassay*), *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan metode mikrobiologi.

Pengembangan metode analisis meliputi evaluasi dan optimasi berbagai tahapan, seperti:

- a. penyiapan sampel
- b. pemisahan analit (obat yang diteliti)
- c. deteksi

d. kuantifikasi

Validasi suatu metode analisis dilakukan untuk menjamin bahwa metode yang akan digunakan adalah valid dan terpercaya. Beberapa parameter digunakan untuk mengevaluasi valid dan metode yang digunakan, antara lain : perolehan kembali (*recovery*) obat dari matriks biologi yang digunakan, presisi dan akurasi. Persyaratan yang dituntut bagi suatu metode tersebut dapat memberikan nilai perolehan kembali yang tinggi (75-90% atau lebih), kesalahan acak dan kesalahan sistematik kurang dari 10%. Kepekaan dan selektivitas peralatan merupakan kriteria lain yang penting, hal mana nilainya akan sangat tergantung dari alat pengukuran yang digunakan. Stabilitas obat yang akan diteliti dalam matrik sampel juga harus diperhatikan.

Berbagai sampel biologis dapat diambil untuk penentuan kadar obat dalam tubuh untuk penelitian farmakokinetika, seperti contoh: darah, urin, feses, saliva, jaringan tubuh, cairan blister, cairan spinal dan cairan sinovial. Darah merupakan sampel biologis yang paling umum digunakan dan mengandung berbagai komponen selular seperti sel darah merah, sel darah putih, platelet, dan berbagai protein seperti albumin dan globulin. Pada umumnya bukan darah utuh (*whole blood*) tetapi plasma atau serum yang digunakan untuk penentuan kadar obat. Serum diperoleh dengan membiarkan darah untuk menggumpal dan supernatan yang dikumpulkan setelah sentrifugasi adalah serum. Sedangkan plasma diperoleh dengan penambahan antikoagulan pada darah yang diambil dan supernatant yang diperoleh setelah sentrifugasi merupakan plasma. Jadi plasma dan serum dibedakan dari protein yang dikandungnya.

Adanya kandungan protein dalam sampel biologis yang akan dianalisa menyebabkan dibutuhkannya suatu tahap perlakuan awal dan/atau penyiapan sampel sebelum penentuan kadar obat dapat digunakan. Hal ini untuk mengisolasi atau memisahkan obat yang akan diteliti dari matriks sampel yang diperoleh. Protein, lemak, garam dan senyawa endogen dalam sampel akan mengganggu penentuan kadar obat yang bersangkutan dan selain itu dalam hal analisa menggunakan metode seperti HPLC adanya zat-zat tersebut dapat merusak kolom HPLC sehingga usia kolom menjadi lebih singkat.

Berbagai prosedur untuk mendenaturasi protein dapat digunakan sebagai perlakuan awal sampel biologis yang diperoleh dari suatu penelitian farmakokinetik, meliputi penggunaan senyawa yang disebut sebagai zat pengendap protein (*protein precipitating agent*) seperti: asam tungstat, ammonium sulfat, asam trikloroasetat (*trichloroacetic acid*, TCA), asam perklorat, menthanol dan asetonitril. Penggunaan pelarut organik seperti methanol dan asetonitril sebagai zat pengendap proteinsangat umum digunakan terutama yang melibatkan metode analisis HPLC. Penggunaan methanol dan asetonitril mempunyai suatu keuntungan karena kompatibilitasnya dengan berbagai eluen yang digunakan dalam metode HPLC. Metode isolasi atau pemisahan obat yang digunakan untuk penelitian farmakokinetika adalah ekstraksi padat-cair (*solid-phase extraction*) dan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi padat-cair menggunakan catridge khusus untuk memisahkan obat dan sampel dengan volume yang relative kecil (0,5-1 mL) yang tersedia secara komersial dengan harga yang cukup mahal. Ekstraksi cair-cair ataupun umumnya diikuti dengan proses pemekatan obat yang akan dianalisa.

Pemilihan pelarut pengestraksi dalam ekstraksi cair-cair harus didasarkan pada sifat fisikokimia obat maupun metabolit yang akan diisolasi. Berbagai faktor dapat menjadi pertimbangan dalam seleksi pelarut yang akan digunakan, antara lain:

- a. *immiscible* (tidak bercampur) dengan air
- b. mempunyai kemampuan melarutkan obat yang diinginkan dalam jumlah yang besar sehingga memberikan nilai *recovery* yang besar

- c. mempunyai titik didih yang relative rendah sehingga waktu evaporasi pelarut dapat lebih singkat
- d. sedapat mungkin volume yang digunakan untuk ekstraksi adalah minimal sehingga akan menekan biaya yang dikeluarkan
- e. jika memungkinkan gunakan pelarut dengan berat jenis yang lebih kecil dari berat jenis air sehingga proses pemisahan pelarut organik akan lebih mudah karena pelarut organik akan berada pada lapisan atas.

PEROLEHAN KEMBALI

Perolehan kembali (*recovery*) dan kesalahan sistematik untuk besaran kadar dihitung dengan persamaan :

$$\text{Perolehan kembali} = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{Kadar diketahui}} \times 100 \%$$

$$\text{Kesalahan sistematik} = 100 - P\%$$

Catatan : perolehan kembali merupakan tolak ukur efisiensi analisis, sedangkan kesalahan sistematik merupakan tolakukur inakurasi penetapan kadar. Kesalahan ini dapat berupa kesalahan atau proporsional.

KESALAHAN ACAK

Kesalahan acak (*random analytical error*) untuk tiap besaran kadar dihitung dengan persamaan :

$$\text{Kesalahan acak} = \frac{\text{simpangan baku}}{\text{Harga rata-rata}} \times 100\%$$

Catatan : kesalahan acak merupakan tolak ukur *imprecision* suatu analisis, dan dapat bersifat positif atau negatif. Kesalahan acak identik dengan variabilitas pengukuran dan dicerminkan oleh tetapan variasi.

6.3. Percobaan

A. Presipitasi protein

1. Pipet 500 μ L plasma blanko ke dalam tabung sentrifugasi
2. Tambahkan zat pengendap protein (asetonitril atau methanol) sebanyak 1 mL
3. Vortex selama \pm 1 menit
4. Sentrifugasi dengan kecepatan 3500-6000 rpm selama 15 menit
5. Pisahkan supernatant yang diperoleh
6. Injeksikan ke dalam system HPLC sebanyak 20 μ L

B. Ekstraksi cair-cair

1. Pipet 500 μ L plasma blanko ke dalam 3 tabung sentrifugasi
2. Tambahkan pelarut pengestraksi : diklorometan sebanyak 5 mL ke dalam satu tabung dan etil asetat sebanyak 5 mL ke dalam 2 tabung lainnya
3. Lakukan proses ekstraksi dengan menaruh tabung dalam “roller mixer” selama 15 menit dengan kecepatan maksimal
4. Sentrifugasi dengan kecepatan 3500-6000 rpm selama 15 menit
5. Pisahkan supernatan yang diperoleh ke dalam tabung sentrifugasi yang baru

6. Uapkan pelarut organik di bawah vakum
7. Rekonstitusi residu yang diperoleh dengan 100 μ L eluen yang digunakan
8. Vortex selama \pm 30 detik
9. Injeksikan ke dalam system HPLC sebanyak 20 μ L
10. Bandingkan kromatogram yang diperoleh dengan kromatogram yang diperoleh menggunakan teknik presipitasi protein

C. Metode Reaksi warna (untuk parasetamol) :

1. Plasma (1 mL) ditambahkan larutan TCA (1 mL; 10%) di dalam tabung
2. sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm, dan tuangkan cairan beningnya kedalam tabung reaksi.
3. Tambahkan HCl (0,5 mL; 6N) dan NaNO₂ (1 mL; 10%), campur baik-baik, diamkan lima menit.
4. Dengan hati-hati tambahkan asam sulfamat (1 mL; 15%), dan kemudian NaOH (2,5 mL; 10%), diamkan 3 menit di tempat dingin.
5. Bacalah intensitas warnanya pada spektrofotometer ($\lambda = 435$ nm)

D. Beberapa analisis zat menggunakan Spektrofotometer visible

Prosedur :

1. Kalium permanganate

Buat larutan kalium permanganate 0,05 % sebanyak 40 mL sebagai larutan induk. Kemudian buat 10 mL larutan kerja dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80, 100% dari larutan induk. Ukur absorban dari tiap larutan pada 570 dan 540 nm. Gunakan air suling sebagai blanko. Buat larutan sampel yang tidak diketahui dan ukur pada 570 dan 540 nm

2. Natrium salisilat

Buat larutan natrium salisilat 0,1% sebanyak 40 mL sebagai larutan induk. Kemudian buat 10 mL larutan kerja dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80, 100% dari larutan induk. Ambil 8mL dari tiap larutan kerja dan tambahkan 2 mL larutan besi nitrat untuk menghasilkan warna. Setelah warna terbentuk secara sempurna, ukur absorban dari tiap larutan pada 540 dan 500 nm. Gunakan 2 mL larutan besi nitrat yang dilarutkan pada 10 ml air suling sebagai blanko. Reagen besi nitrat adalah besi nitrat 1% dalam asam nitrat 1%.

Presentasi Data

Buatlah grafik kurva baku dari setiap larutan pada panjang gelombang yang digunakan. Hitung koefisien ekstingsi untuk setiap grafik. Gunakan panjang jalur 1 cm.

MODUL 7
MODEL IN VITRO FARMAKOKINETIK OBAT SETELAH PEMEBERIAN
SECARA BOLUS INTRAVENA

7.1. Tujuan :

Setelah mengikuti percobaan ini mahasiswa diharapkan :

1. Memahami proses in vivo dan perkembangan kadar obat dalam darah setelah pemberian obat secara bolus intravena
2. Mampu memplot data kadar obat dalam fungsi waktu pada skala semilogaritmik
3. Mampu menentukan berbagai parameter farmakokinetika obat yang berkaitan dengan pemberian obat secara bolus intravena.

7.2. Pendahuluan

Secara garis besar obat dapat diberikan secara intravaskular (langsung masuk ke dalam pembuluh darah) dan ekstrasvaskular (di luar pembuluh darah seperti pemberian secara oral, rectal, injeksi intramuskular, dll). Pada pemberian secara ekstrasvaskular, obat akan masuk ke dalam system peredaran darah melalui proses absorpsi. Pemberian secara intravaskular dapat dilakukan secara bolus (sekaligus, seperti injeksi intravena) atau secara kontinyu dengan suatu kecepatan yang konstan seperti cara infus.

Setelah masuk ke dalam sistem peredaran darah, obat akan mengalami proses distribusi, metabolisme dan ekskresi. Proses metabolisme dan ekskresi merupakan proses eliminasi. Adanya berbagai proses yang terjadi akan menyebabkan terjadinya perbedaan kadar obat dalam darah terhadap fungsi waktu.

Dengan pendekatan permodelan matematis, kinetika obat dalam darah dapat digambarkan dengan suatu model kompartemenal: satu kompartemen dan multi-kompartemen. Kinetika perubahan kadar obat untuk setiap proses yang terjadi mengikuti kinetika orde satu.

Pada pemberian, secara bolus intravena, obat seluruhnya akan sekaligus masuk ke dalam system peredaran darah sehingga pada waktu pemberian obat kadar adanya proses distribusi ke dalam jaringan lain dan eliminasi.

Persamaan kinetika obat dalam darah pada pemberian secara bolus intravena dengan suatu dosis D yang mengikuti model satu kompartemen diberikan dengan persamaan berikut :

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

Dimana C_t adalah kadar obat dalam waktu t, C_0 adalah kadar obat pada waktu 0, k atau kt adalah konstanta kecepatan eliminasi obat.

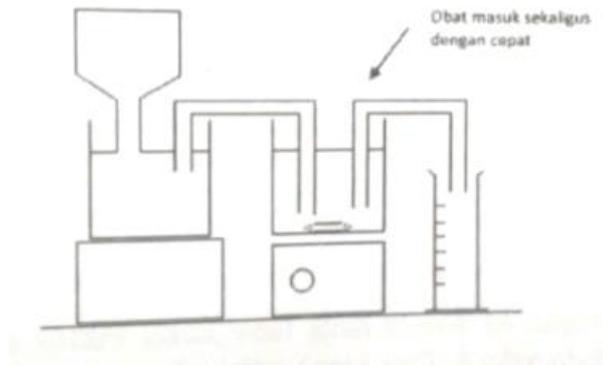
Dengan menentukan kadar obat pada berbagai waktu, harga C_0 dan k dapat dihitung dengan regresi linier setelah persamaan ditransformasikan kedalam nilai logaritmik: $\ln C_t = \ln C_0 - kt$

Setelah ditentukan nilai C_0 dan k, berbagai parameter farmakokinetika obat yang berkaitan dengan cara pemberian obat secara bolus intravena dapat dihitung, seperti nilai volume distribusi (V_d), Klirens (Cl) dan waktu paro eliminasi ($T_{1/2}$).

$$V_d = \frac{D}{C_0}$$

$$Cl = V_d \cdot k$$

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$



7.3. Prosedur:

1. Isi wadah dengan 250 mL air.
2. Buat sejumlah volume larutan obat dengan kadar tertentu; masukkan sekaligus ke dalam wadah.
3. Jalankan segera pompa peristaltik/kran untuk pengeluaran cairan dari dalam wadah dan pompa peristaltik untuk penggantian air yang hilang dari wadah.
4. Ambil cuplikan sebanyak 5 mL pada waktu 15, 30, 45, 60, 90 dan 120 menit setelah volume sama dengan volume cuplikan.
5. Tentukan kadar obat dalam cuplikan (secara spektrofotometri)
6. Plot data kadar obat terhadap waktu pada kertas semilogaritmik.
7. Hitung harga C_0 dan k
8. Hitung harga V_d , Cl dan $T_{1/2}$.

MODUL 8
MODEL IN VITRO FARMAKOKINETIK OBAT
SETELAH PEMBERIAN SECARA INFUS

8.1. Tujuan

Setelah mengikuti percobaan ini mahasiswa diharapkan :

1. Memahami proses in vivo dan perkembangan kadar obat dalam darah setelah pemberian obat secara infus.
2. Mampu memplot data kadar obat dalam fungsi waktu pada skala semilogaritmik.
3. Mampu menentukan berbagai parameter farmakokinetika obat berkaitan dengan pemberian obat secara bolus intravena.

8.2. Pendahuluan

Pada pemberian secara infus, obat akan masuk ke dalam system peredaran darah dengan suatu kecepatan yang konstan (orde nol). Kadar obat dalam darah akan naik secara perlahan sampai mencapai suatu kadar yang konstan (jika infus diberikan cukup lama) atau sampai infus dihentikan. Setelah infus dihentikan kadar obat akan menurun karena obat mengalami eliminasi tanpa ada lagi obat yang masuk.

Selama infus pada laju konstan, konsentrasi obat pada setiap waktu t dapat dihitung jika laju infusi (R), volume distribusi (V_d) dan tetapan eliminasi (K) diketahui :

$$C_p = \frac{R}{V_d \cdot K} (1 - e^{-kt})$$

Setelah infuse dihentikan, maka konsentrasi obat dapat dihitung berdasarkan persamaan :

$$C_p = \frac{R}{V_d \cdot K} (1 - e^{-kt}) e^{-k(t-t_1)}$$

K (tetapan kecepatan eliminasi) dapat diperoleh dari slop kurva eliminasi.

C_p = konsentasi obat dalam darah, plasma/serum ($\mu\text{g/mL}$)

R = kecepatan infus orde nol ($\mu\text{g/mL}$)

t_1 = waktu infuse (jam)

t = total waktu infuse

selanjutnya kita dapat menghitung parameter-parameter lainnya, yaitu CI dan $T_{1/2}$.

8.3. Prosedur

1. Isi wadah dengan 250 mL air.
Buat sejumlah volume larutan obat dengan kadar tertentu; masukkan sekaligus ke dalam wadah.
2. Jalankan sekrab bersamaan pompa peristaltic untuk mengeluarkan cairan dari dalam wadah dan pompa peristaltik untuk memasukan infus.
3. Hentikan infus pada menit ke 60 dan setelah itu infus diganti dengan air dan masukkan ke dalam wadah dengan kecepatan yang sama.
Teruskan proses sampai menit ke 180.
Ambil cuplikan sebanyak 5 mL pada waktu 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 menit setelah rangkaian alat dijalankan. Setiap kali pengambilan cuplikan tambahkan sejumlah air volume sama dengan volume cuplikan.
4. Tentukan kadar obat dalam cuplikan (secara spektrofotometri).

5. Plot data kadar obat terhadap waktu pada kertas semilogaritmik.
 - a. Hitung harga V_d dan K .
 - b. Hitung harga Cl dan $T_{1/2}$.

MODUL 9
PENETAPAN MODEL KOMPARTEMEN
DALAM ANALISIS PROFIL FARMAKOKINETIKA OBAT

9.1. TUJUAN

Mahasiswa mampu menetapkan model kompartemen yang sesuai berdasarkan kurva semilogaritmik kadar obat dalam plasma/darah terhadap waktu untuk penetapan profil farmakokinetika obat.

9.2. PRINSIP

Mengasumsikan tubuh sebagai suatu susunan atau sistem dari kompartemen – kompartemen yang berhubungan secara timbal balik.

Menganggap kompartemen sebagai jaringan/kelompok jaringan yang mempunyai aliran dan afinitas yang sama terhadap obat.

Menganggap obat pada masing – masing kompartemen terdistribusi secara cepat, merata dan homogen.

9.3. TEORI

Obat dalam menghasilkan efek harus terdistribusi ke dalam jaringan/organ target dalam jumlah yang cukup, kemudian dapat berinteraksi dengan reseptornya. Namun, dalam menentukan jumlah tersebut sulit dilakukan apabila harus mengukur secara langsung kadar obat di dalam jaringan/organ target karena kondisi di dalam tubuh sangat dinamis serta sulit untuk mengakses ke dalam jaringan/organ target tersebut.

Secara umum, terdapat dua pendekatan yang dapat dilakukan untuk mengkaji secara kuantitatif beberapa proses kinetika atau disposisi obat di dalam tubuh, yaitu:

1. Pendekatan menggunakan model
2. Pendekatan yang tidak bergantung pada model

Model adalah suatu asumsi penyederhanaan anggapan gambaran sistem biologis ke dalam istilah matematika. Model ini berguna untuk:

- Memperkirakan kadar obat dalam plasma, jaringan, dan urin pada berbagai regimen dosis,
- Menghitung pengaturan dosis optimum untuk tiap penderita secara individual,

- Menjelaskan hubungan konsentrasi obat dengan aktivitas farmakologik/toksikologik,
- Menggambarkan perubahan faal/penyakit dapat mempengaruhi absorpsi, distribusi dan eliminasi obat,
- Menjelaskan interaksi obat

Ada 3 jenis pendekatan menggunakan model dalam analisis farmakokinetika, yaitu model kompartemen, model fisiologis dan model parameter distribusi. Model kompartemen merupakan model yang paling umum digunakan. Dalam model kompartemen, tubuh dianggap sebagai suatu susunan atau sistem dari kompartemen – kompartemen yang berhubungan secara timbal balik. Kompartemen tersebut dianggap sebagai jaringan/kelompok jaringan yang mempunyai aliran dan afinitas yang sama terhadap obat, sehingga obat terdistribusi secara cepat, merata dan homogen dalam masing – masing kompartemen. Jenis – jenis model kompartemen diantaranya:

A. Model Mamillary

Model Mammillary merupakan model kompartemen yang paling umum digunakan dalam farmakokinetika. Model terdiri atas satu atau lebih kompartemen perifer yang dihubungkan ke suatu kompartemen sentral. Kompartemen sentral mewakili plasma dan jaringan-jaringan yang perfusinya tinggi dan secara cepat berkesetimbangan dengan obat. Model Mammillary dapat dianggap sebagai suatu sistem yang berhubungan secara erat, karena jumlah obat dalam setiap kompartemen dalam sistem tersebut dapat diperkirakan setelah obat dimasukkan ke dalam suatu kompartemen tertentu. Bila suatu obat diberikan secara IV, obat secara langsung masuk ke dalam kompartemen sentral. Eliminasi obat dari kompartemen sentral terjadi oleh karena organ-organ yang terlibat dalam eliminasi obat terutama ginjal dan hati, merupakan jaringan yang diperfusi secara baik.

Tetapan laju dari farmakokinetika dinyatakan dengan huruf k. Kompartemen satu mewakili plasma atau kompartemen sentral, sedangkan kompartemen dua mewakili kompartemen jaringan.

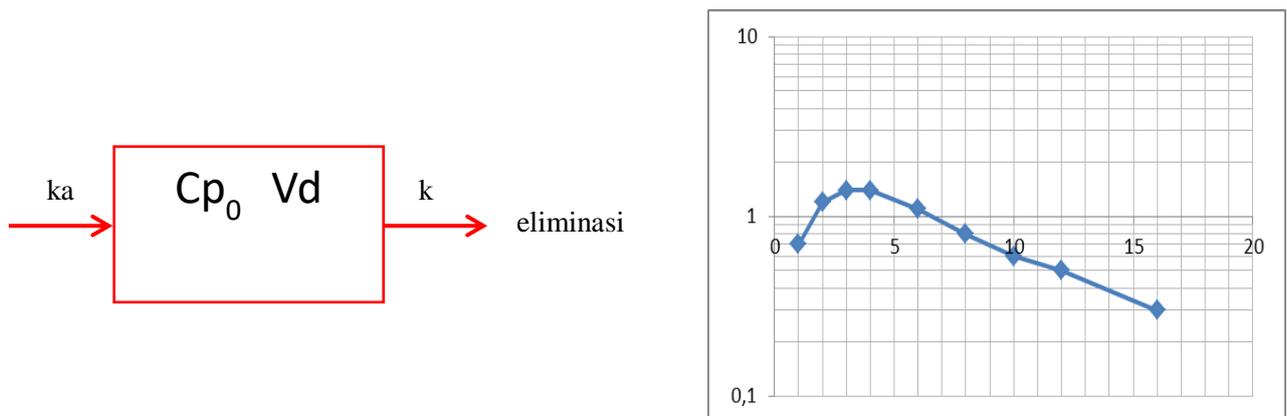
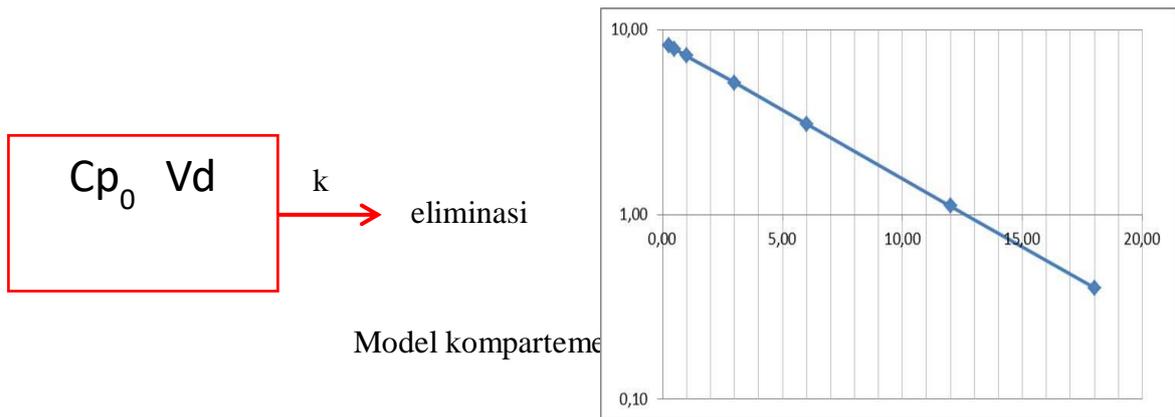
Penggambaran model ini mempunyai tiga kegunaan, yaitu :

1. memungkinkan ahli farmakokinetika merumuskan persamaan diferensial untuk menggambarkan perubahan konsentrasi obat dalam masing-masing kompartemen,

2. memberikan suatu gambaran nyata dari laju proses, dan
3. menunjukkan berapa banyak tetapan farmakokinetik yang diperlukan untuk menggambarkan proses secara memadai.

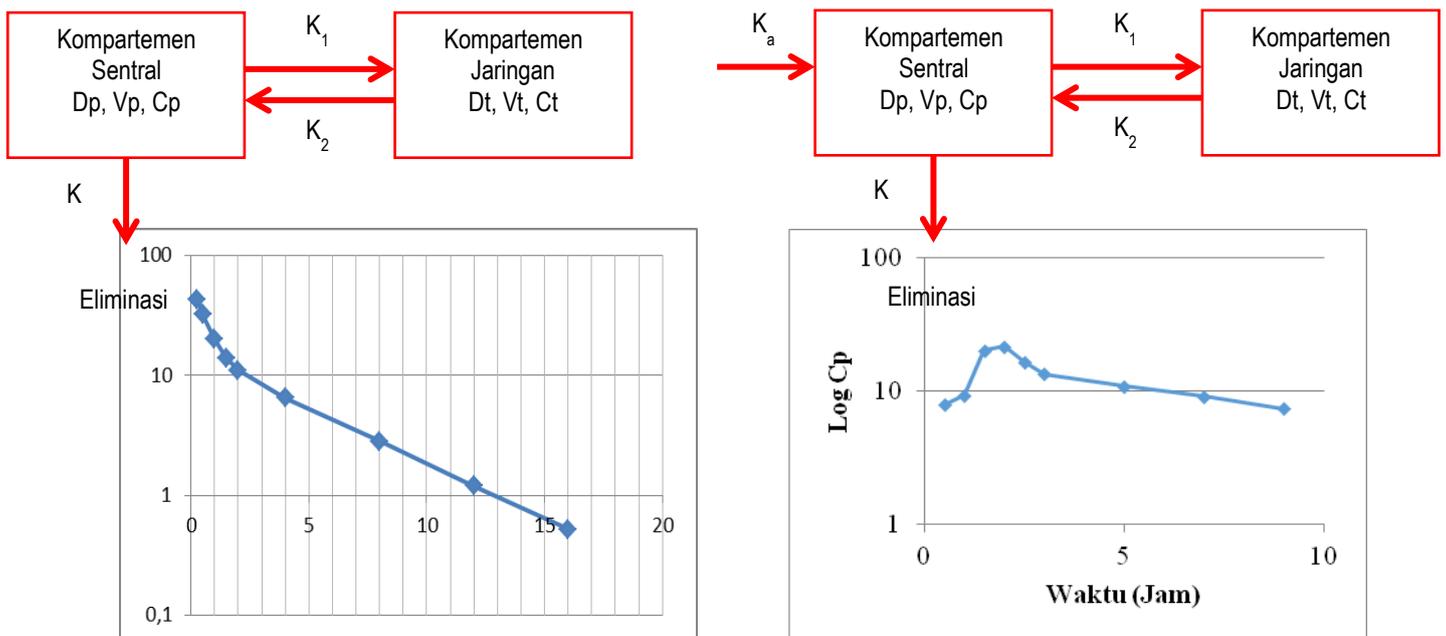
Model Kompartemen Satu-Terbuka

Model kompartemen-satu terbuka menganggap obat terdistribusi ke seluruh jaringan melalui sirkulasi darah secara cepat. Jumlah obat cepat mencapai kesetimbangan diantara jumlah obat yang berada di darah/plasma dengan di jaringan (konsentrasi obat dalam plasma merepresentasikan konsentrasi obat dalam seluruh jaringan tubuh) menghasilkan satu garis linier pada kurva semilogaritmik kadar obat terhadap waktu (monoeksponen). Laju eliminasi obat merupakan suatu proses orde kesatu. Laju input obat (absorpsi) lebih cepat dibandingkan laju pengeluarannya (eliminasi)



Model Kompartemen Dua-Terbuka

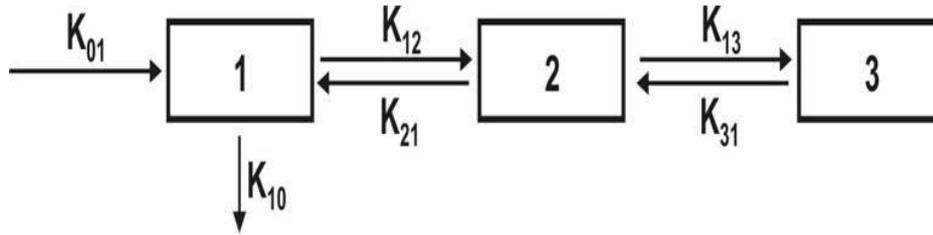
Model ini diperlukan untuk menjelaskan adanya kurva kadar obat dalam plasma/darah terhadap waktu yg tidak menurun linier sebagai suatu proses orde kesatu. Obat didistribusikan dengan laju yang tidak sama ke dalam berbagai kelompok jaringan yang berbeda. Jadi, terdapat beberapa kelompok jaringan yang aliran darahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kompartemen sentral (plasma/darah, jantung, ginjal dll) tetapi memiliki aliran serta afinitas yg sama terhadap obat. Berdasarkan hal tersebut, obat dianggap dimodelkan ke dalam lebih dari satu kompartemen, akan tetapi saling berhubungan dengan kompartemen sentral dan akan mencapai kesetimbangan kemudian, sehingga akhirnya kurva kadar obat dalam plasma/darah terhadap waktu mencerminkan fase eliminasi. Analisis kinetiknya menganggap semua proses laju pemindahan obat merupakan orde kesatu. Eliminasi terjadi pada kompartemen sentral dan merupakan suatu proses orde kesatu.



Model kompartemen dua terbuka injeksi iv dan dengan absorpsi orde ke satu

B. Model Catenary

Model catenary terdiri dari kompartemen-kompartemen yang bergabung satu dengan yang lain menjadi satu deretan kompartemen. Model kompartemen ini tidak bisa dipakai pada sebagian besar organ yang secara langsung berhubungan dengan plasma sehingga model ini jarang digunakan.



Model kompartemen catenary

I. ALAT DAN BAHAN

A. Alat – Alat

- Timbangan analitik
- Kuvet kuarsa 1 ml
- Mikropipet
- Spektrofotometer UV-Vis
- HPLC dengan Kolom C18
- spuit 3 cc, (96 pcs)
- needle 25Gx1/2inch, (24)
- needle 25Gx1 inch, (24)
- sonde oral, (24)
- stopwatch,
- Tabung sentrifugasi 10 ml (72 pcs)
- Eppendorf 1,5 ml (72 pcs)
- Sentrifugator
- Mikro Sentrifugator
- Vorteks
- Kertas grafik semilogaritmik
- Chamber CO₂

B. Bahan

- Bahan/obat yang akan ditetapkan model kompartemennya adalah EPMS dan Kurkumin *soluble*.
- Bahan/obat tersebut ditetapkan model kompartemennya pada tikus jantan galus wistar.
- Standar kurkumin
- Standar EPMS
- Asetonitril
- Asam fosfat
- Akuabides
- Akuades
- Asam asetat
- Metanol

II. PROSEDUR

A. Penetapan model kompartemen Kurkumin *Soluble*

1. 5 ekor tikus disiapkan untuk penetapan model kompartemen kurkumin *soluble*.
2. Pada masing – masing tikus, kurkumin *soluble* diberikan per oral dengan dosis 10 mg/kg.
3. Cuplikan darah diambil 0,2 ml pada T1 smapai T12 sesuai dengan hasil penetapan waktu sampling pada modul sebelumnya. Cuplikan darah ditampung di dalam tabung eppendorf.
4. Cuplikan darah didiamkan selama 1 jam, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm.
5. Serum dipisahkan dengan cara dekantasi cairan bening menggunakan mikropipet, ditampung ke dalam tabung eppendorf.
6. Ke dalam serum ditambahkan 200 μ L asetonitril untuk mengendapkan protein, kemudian sentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 4000 rpm. Pisahkan larutan dengan endapan.

7. Bagian larutan kemudian disentrifugasi lagi selama 10 menit.
8. Injeksikan sampel sebanyak 40 μL kedalam HPLC,
Kondisi HPLC :
Panjang gelombang : 420nm
Laju Alir : 1 mL/menit
Fasa gerak : Asetonitril : Water : asam Phospat 1% (50:49:1)
9. Data farmakokinetika yang diperoleh ditulis ke dalam bentuk tabel.
10. Buat grafik kadar terhadap waktu dalam kertas semilogaritmik.
11. Berdasarkan grafik yang diperoleh, tetapkan model kompartemen yang sesuai untuk EPMS.

B. Penetapan model kompartemen EPMS

1. 5 ekor tikus disiapkan untuk penetapan model kompartemen EPMS.
2. Pada masing – masing tikus, EPMS diberikan per oral dengan dosis 10 mg/kg.
3. Cuplikan darah diambil 0,2 ml pada T1 sampai T12 sesuai dengan hasil penetapan waktu sampling pada modul sebelumnya. Cuplikan darah ditampung di dalam tabung eppendorf.
4. Cuplikan darah didiamkan selama 1 jam, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm.
5. Serum dipisahkan dengan cara dekantasi cairan bening menggunakan mikropipet, ditampung ke dalam tabung eppendorf.
6. Ke dalam serum ditambahkan 200 μL asetonitril untuk mengendapkan protein, kemudian sentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 4000 rpm. Pisahkan larutan dengan endapan.
7. Bagian larutan kemudian disentrifugasi lagi selama 10 menit.
8. Injeksikan sampel sebanyak 40 μL kedalam HPLC,
Kondisi HPLC :
Panjang gelombang : 308nm

Laju Alir : 1 mL/menit

Fasa gerak : Metanol : water (80:20)

9. Data farmakokinetika EPMS yang diperoleh ditulis kedalam bentuk tabel.
10. Buat grafik kadar terhadap waktu dalam kertas semilogaritmik.
11. Berdasarkan grafik yang diperoleh, tetapkan model kompartemen yang sesuai untuk EPMS.

III. DAFTAR PUSTAKA

Shargel, L., and Yu, Andrew, 2005, *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 5th Appleton and Lange, New York.

MODUL 10
PENETAPAN PARAMETER FARMAKOKINETIK OBAT
SETELAH PEMBERIAN DOSIS TUNGGAL MENGGUNAKAN
DATA DARAH

10.1. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu menetapkan dan menghitung parameter farmakokinetik obat setelah pemberian dosis tunggal berdasarkan data kadar obat dalam darah/plasma terhadap waktu.

10.2. Pendahuluan

Seperti telah diketahui bahwa parameter farmakokinetik adalah besaran yang diturunkan secara matematis dari model berdasar hasil pengukuran kadar obat utuh dan atau metabolitnya di dalam darah, urin atau cairan hayati lainnya. Mengapa demikian ? disamping yang paling cepat dicapai obat, darah juga tempat yang paling logis bagi penetapan kadar obat di dalam badan. Dalam praktek, uji dengan data darah paling banyak digunakan. Karena darahlah yang mengambil obat dari tempat absorpsi, menyebarkan ke tempat distribusi/aksi, serta membuangnya ke organ eliminasi.

Kegunaan menetapkan parameter farmakokinetik suatu obat adalah untuk mengkaji kinetika absorpsi, distribusi dan eliminasinya di dalam tubuh. Dimana hasil kajian ini, memiliki arti penting dalam penetapan aturan dosis. Parameter farmakokinetik yang dapat dipergunakan untuk mengkaji kinetika absorpsi suatu obat diantaranya adalah tetapan kecepatan absorpsi (K_a), luas daerah di bawah kurva (AUC), dan fraksi obat yang diabsorpsi (f_a). Sedangkan untuk kinetika distribusi adalah volume distribusi (V_d dan V_{dss}). Dan untuk kinetika eliminasi adalah klirens total (Cl_t), tetapan kecepatan eliminasi (K_{el} atau β), dan waktu paruh eliminasi ($T_{1/2}$).

Cara perhitungan parameter-parameter farmakokinetik tersebut, dapat dikerjakan seperti pada tabel I dan II, setelah diperoleh data kadar obat dari dalam darah/plasma terhadap waktu. Terlihat pada kedua tabel tersebut, bahwa untuk menghitung parameter farmakokinetik setelah pemberian oral (V_d , Cl_t), diperlukan parameter f_a . Parameter f_a ini diperoleh dengan membagi harga AUC oral dengan AUC intravena. Dengan kata lain data intravena juga diperlukan untuk menghitung parameter farmakokinetik obat setelah pemberian oral.

Tabel I
Persamaan parameter farmakokinetika obat model satu kompartemen

| Kinetika | Parameter | Perhitungan | | Satuan |
|------------|-------------------------|------------------------|--|------------------------|
| | | Intravena | Oral | |
| Absorpsi | 1. Ka | - | Residual | menit ⁻¹ |
| | 2. AUC _{0-inf} | Trapezoid | Trapezoid | µg.ml ⁻¹ |
| | 3. fa | - | AUC _{p.o} /AUC _{0-inf} | menit |
| Distribusi | 4. Vd | D/CP | D.f _a /CP | ml |
| | 5. CL | D/AUC _{0-inf} | D.f _a /AUC _{0-inf} | ml.menit ⁻¹ |
| Eliminasi | 6. K _{el} | Regresi | Regresi | menit ⁻¹ |
| | 7. t _{1/2} | Log. Linier | Log. Linier | menit |
| | | 0.693/ K _{el} | 0.693/ K _{el} | |

Tabel II
Persamaan parameter farmakokinetika obat model dua kompartemen

| Kinetika | Parameter | Perhitungan | | Satuan |
|------------|-------------------------|---|---|------------------------|
| | | Intravena | Oral | |
| Absorpsi | 1. Ka | - | Residual | menit ⁻¹ |
| | 2. AUC _{0-inf} | B/β + A/α | M/β + L/(α - N/K _{el}) | µg.ml ⁻¹ |
| | 3. fa | - | AUC _{p.o} /AUC _{i.v} | menit ⁻¹ |
| Distribusi | 1. α | Residul $\frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{A + B}$ | Residul $\frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{A + B}$ | menit ⁻¹ |
| | 2. k ₁₂ | A + B | A + B | menit ⁻¹ |
| | 3. k ₂₁ | α + β - K ₁₂ K _{el} | α + β - K ₁₂ K _{el} | menit ⁻¹ |
| | 4. Vc | $\frac{D}{A + B}$ | $\frac{D \cdot f_a}{A + B}$ | ml |
| | 5. Vd _{ss} | $\frac{K_{12} + K_{21}}{K_{21}} V_C$ | $\frac{K_{12} + K_{21}}{K_{21}} V_C$ | ml |
| Eliminasi | 1. Cl _t | $\frac{D}{AUC_{0-inf}}$ | $\frac{D \cdot f_a}{AUC_{0-inf}}$ | ml.menit ⁻¹ |
| | 2. β | Regresi log linier $\frac{0,693}{\beta}$ | Regresi log linier $\frac{0,693}{\beta}$ | menit ⁻¹ |
| | 3. t _{1/2β} | $\frac{\beta}{\alpha \cdot \beta}$ | $\frac{\beta}{\alpha \cdot \beta}$ | menit |
| | 4. K _{el} | $\frac{\alpha \cdot \beta}{K_{12}}$ | $\frac{\alpha \cdot \beta}{K_{12}}$ | manit ⁻¹ |

10.3.Percobaan

BAHAN :

1. Larutan steril parasetamol 15% dalam Propilen glikol 4% - garam fisiologis
2. Suspense parasetamol 10% dalam tilose 1%
3. Pereaksi : lihat percobaan sebelumnya

ALAT :

1. Kateter, mouthblock
2. Peralatan lainnya seperti pada percobaan sebelumnya.

PROSEDUR

Penetapan parameter Farmakokinetik Parasetamol

A. Setelah pemberian Intravena :

1. Seekor kelinci ditimbang dan dihitung volume suntikan yang akan diberikan.
 2. Ambil darah blanko ($\pm 2,5$ mL).
 3. Suntik pelan – pelan melalui vena marginalis dengan larutan steril paracetamol dengan dosis yang telah ditentukan (lihat percobaan sebelumnya).
 4. Ambil dari vena marginalis telinga ($\pm 2,5$ mL) pada interval tertentu ke dalam wadah yang berisiantikoagulan.
 5. Tetapkan kadar parasetamol (lihat percobaan sebelumnya) menggunakan kurva baku terdahulu.
 6. Berdasarkan kurva semilog kadar plasma terhadap waktu, hitung parameter farmakokinetik paracetamol (AUC 0-, V_c , V_{dss} , Cl_t , β , $T_{1/2}$, β , k_{12}), menggunakan Tabel II.
- A. Setelah pemberian oral
1. Seekor kelinci di timbang, dan diambil darah blankonya.
 2. Terlentangkan pada papan fiksasi, dan dengan kateter dan mounblock, berikan suspensi paracetamol 10% di dalam 1%; dosis 300 mg/KgBB.
Catatan : sebelum pemberian obat, dilihat dahulu apakah kateter sudah masuk ke dalam lambung kelinci. Jika ujung kateter lainnya di celupkan ke dalam air, dan timbul gelembung udara, berarti masuk ke dalam paru.
 3. Pada menit ke 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 60, 90, 120, 150, 180 dan 240, ambil darah melalui vena marginalis ($\pm 2,5$ mL), tampung dalam wadah berisi antikoagulan.
 4. Sentrifuse, ambil plasma (1 mL) untuk penetapan kadar paracetamol. Berdasarkan plot log kadar-waktu, tetapkan parameter kinetik paracetamol seperti pada pemberian intravena. Tetapkan pula K_a dan f_a obat tersebut.
Catatan :
- a. Harga K_{el} , diperoleh dari slope terminal semilog plot kadar darah terhadap waktu. Variable x = waktu, variable y = log kadar. ($\log C_p = \log C_p 0 - K_{el} \cdot t / 2,303$)
 - b. Harga AUC 0-t diperoleh dari metode trapezoid
 - c. Harga β diperoleh dari slope fase terminal dari semilog plot kadar plasma lawan-waktu, menggunakan 3-4 titik untuk garis regresi.
 - d. Harga α diperoleh dengan metode residual.

PERCOBAAN 11
PENETAPAN PARAMETER FARMAKOKINETIKA OBAT
SETELAH PEMBERIAN DOSIS TUNGGAL MENGGUNAKAN
DATA EKSKRESI URIN KUMULATIF

11.1. Tujuan

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu menghitung parameter farmakokinetika obat setelah pemberian dosis tunggal melalui oral, berdasarkan data ekskresi urin kumulatif.

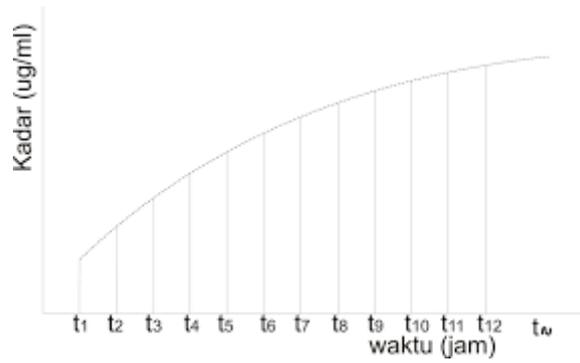
11.2. Pendahuluan

Selain dengan contoh darah, parameter farmakokinetik suatu obat juga dapat ditetapkan dari pengukuran kadar obat atau metabolitnya di dalam urin. Sebenarnya pengukuran atau penggunaan cuplikan urin ini dapat lebih baik dari cuplikan darah, terutama jika obat diekskresikan ke dalam urin secara sempurna dalam bentuk tak berubah. Mengapa demikian karena data urin mengukur langsung jumlah obat yang berada di dalam badan, kadar obat dalam urin lebih besar daripada dalam darah, volume yang tersedia lebih besar, dan yang penting adanya variabilitas kliren renal dapat diabaikan. Namun demikian, penggunaan data urin ini memiliki beberapa keterbatasan, yakni sulit diperoleh pengosongan kandung kencing yang sempurna, ada kemungkinan terjadi dekomposisi obat selama penyimpanan, dan adanya kemungkinan terjadi hidrolisis konjugat metabolit yang tak stabil di dalam urin. Akibatnya, dapat mempengaruhi jumlah total obat dalam bentuk tak berubah yang diekskresikan ke dalam urin dalam waktu tak terhingga. Dengan demikian jelas akan mempengaruhi validitas hasil perhitungan parameter farmakokinetiknya.

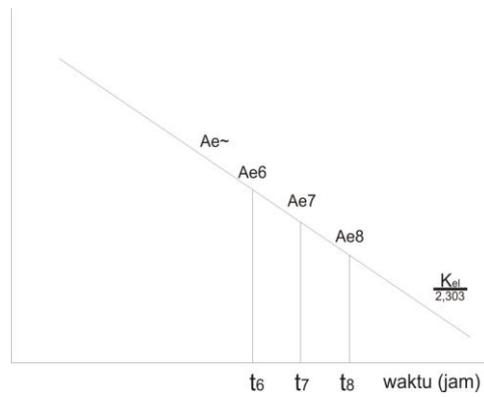
Metode ekskresi urin kumulatif ini biasanya dipergunakan untuk menetapkan parameter k_{el} , f_a , $T_{1/2}$, persen (%) yang diabsorpsi, jumlah obat yang akhirnya diabsorpsi, serta besar ketersediaan hayati obat ($EBA = \text{Extent of Bioavailability of Drug}$).

Untuk memperoleh harga tetapan kecepatan eliminasi (K_{el}) tersebut di atas, dapat dikerjakan dengan metode ARE (*Amount of Drug Remaining to be Excreted*), pengumpulan cuplikan urin setelah pemberian suatu produk obat, berlangsung sampai seluruh obat tak berubah praktis telah diekskresikan seluruhnya dari tubuh, yakni pada waktu tak terhingga (gambar VII.1).

Harga K_{el} kemudian diperoleh dari plot semilogaritmik beberapa titik terakhir ARE terhadap waktu. Dimana ARE ini diperoleh dengan mengurangi A_e , dengan A_e sampai waktu tertentu, seperti terlihat pada gambar VII.2.

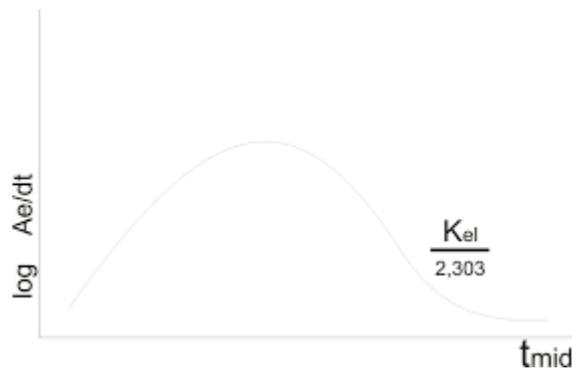


Gambar VII.1. plot numerik jumlah kumulatif obat yang diekskresikan dalam urin vs waktu.



Gambar VII.2. plot semi logaritmik ARE terhadap waktu untuk penetapan K_{el} .

Dengan metode ekskresi renal, pengumpulan cuplikan urin, tidak diperlukan sampai seluruh obat tak berubah praktik diekskresikan secara sempurna dari tubuh dan harga K_{el} dapat diperoleh dari plot semilogaritmik kecepatan ekskresi (dAe/dt) lawan waktu tengah seperti terlihat pada gambar VII.3.



Gambar VII.3. plot semi logaritmik kecepatan ekskresi obat tak berubah lawan waktu guna mencari K_{el} .

Guna memperoleh parameter farmakokinetik suatu obat menggunakan data ekskresi urin kumulatif, diperlukan serangkaian langkah yang dapat diringkas seperti terlihat pada tabel 1 dan 2.

Ringkasan langkah penetapan parameter farmakokinetika dengan data ekskresi urin kumulatif

Tabel 1

| No | Int.peng.cup | T _{midp} | C _u | V | A _{ei} | A _e | dA _e /dt | 1/K _{el} .dA/dt | A _t (f) | % abs |
|----|----------------------------------|-------------------|----------------|---|-----------------|----------------|---------------------|--------------------------|--------------------|-------|
| 1 | t ₀ -t ₁ | | | | | | | | | |
| 2 | t ₁ -t ₂ | | | | | | | | | |
| 3 | t ₂ -t ₃ | | | | | | | | | |
| n | t _{n-1} -t _n | | | | | | | | | |

Tabel II

Ringkasan cara perhitungan parameter farmakokinetika dengan data ekskresi urin kumulatif

| No | Simbol | Perhitungan |
|----|-------------------------------------|--|
| 1 | T _{midp} (jam) | $t_{n-1} + t_n/2$ |
| 2 | C _u (mg/ml) | resapan yang terbaca pada masing-masing interval pengambilan cuplikan masukkan pada persamaan garis kurva baku yang dipergunakan |
| 3 | V (ml) | besarnya volume urin yang diekskresikan setiap pengambilan cuplikan |
| 4 | A _{ei} (mg) | C _u X V |
| 5 | A _e (mg) | \sum A _{ei} selama interval waktu pengambilan cuplikan |
| 6 | dA _e /dt (mg/jam) | $A_{e_{t_n}} - A_{e_{t_{n-1}}}/t_n - t_{n-1}$ |
| 7 | K _{el} | Metode ARE |
| | | Regresi linier antara X (t) lawan Y (Ln Ae – Ae) pada beberapa titik terakhir interval waktu pengambilan cuplikan. |
| | | Metode ekskresi renal |
| | | Regresi aln linier antara X (t _{midp}) lawan Y (Ln dAe/dt) pada beberapa titik terakhir fase eliminasi. |
| 8 | A _{t(f)} (mg) | $(1/K_{el} dAe/dt) + Ae$ |
| 9 | A _{t(f)As} (mg) | Diperoleh setelah obat praktis diabsorpsi seluruhnya. Yakni harga rata-rata A _t (f) dimana harganya praktis sudah tidak bertambah lagi (ajeg) |
| 10 | % obat yang diabsorpsi | $A_{T(f)}/ A_{t(f)As} \times 100\%$ |
| 11 | K _a (jam ⁻¹) | Regresi Ln linier antara X (t) beberapa titik fase absorbsi lawan Y (Ln (1-A _{t(f)} /A _{t(f)As})) |
| 12 | F _a | A _{t(f)As} / dosis |

12. PERCOBAAN

Pra percobaan :

1. *Water-Loading*

- Satu jam sebelum minum obat, manusia uji terlebih dahulu diberi air 400 ml, kemudian 200 ml pada saat minum obat, dan 4 kali setiap satu jam lalu sebanyak 200 ml untuk jam berikutnya
- Sebelum minum obat, isi kandung kencing harus dikosongkan secara sempurna. Ambil urin secukupnya untuk blanko.
- Setiap interval waktu pengambilan cuplikan, volume urin yang diekskresikan harus dicatat.
- Jika urine tidak segera dianalisis, harus disimpan dalam lemari pendingin sampai analisis dikerjakan. Untuk keperluan ini urin dapat diberikan toluene setengah sampai satu ml.
- Jaga jangan samapai ada satupun cuplikan urin yang hilang.
- Pengumpulan urin dikerjakan sampai seluruh obat tak berubah praktis telah diekskresikan seluruhnya dalam urin ($7-10 \times t^{1/2}$).
- Usahakan pengosongan kandung kencing setiap interval waktu pengambilan dikerjakan sempurna.

Prosedur Percobaan

- Tentukan manusia untuk relawan. Dua hari sebelum praktikum relawan sudah mulai minum obat uji. Satu minggu sebelum praktikum tidak diperkenankan minum obat yang sejenis dengan obat uji atau obat lain yang dapat mengganggu penetapan kadar obat uji.
- Sebelum minum obat, tetapkan terlebih dahulu interval waktu pengambilan cuplikan.
- Minum obat uji (tablet 500 mg). perhatikan sistem *water-loading*. Jangan lupa untuk mengambil urin blanko sebelum minum obat.
- Kumpulkan cuplikan urin pada sederetan interval waktu yang sudah ditentukan sebelumnya. Catat volume urin pada setiap interval waktu pengambilan cuplikan yang diperoleh. Ambil kurang lebih 10 ml, masukkan ke dalam flakon dan simpan dalam lemari es.
- Tetapkan kadar obat uji utuh di dalam cuplikan urin.
- Data kadar obat dalam urin yang diperoleh pada setiap interval waktu pengambilan cuplikan, masukkan dalam tabel 1. Selanjutnya hitung parameter farmakokinetik obat (K_{el} , $t^{1/2}$, K_a , f_a , persen jumlah obat yang diabsorpsi, jumlah obat yang pada akhirnya diabsorpsi) dengan cara melengkapi isian pada tabel I. selanjutnya, berdasarkan pada cara perhitungan yang terdapat pada tabel II.
- Simpulkan hasilnya dan laporkan.

Catatan: jika resapan yang terbaca terlalu besar, maka lakukan pengenceran terhadap urin yang masih tersedia, jangan terhadap urin yang sudah direaksikan.