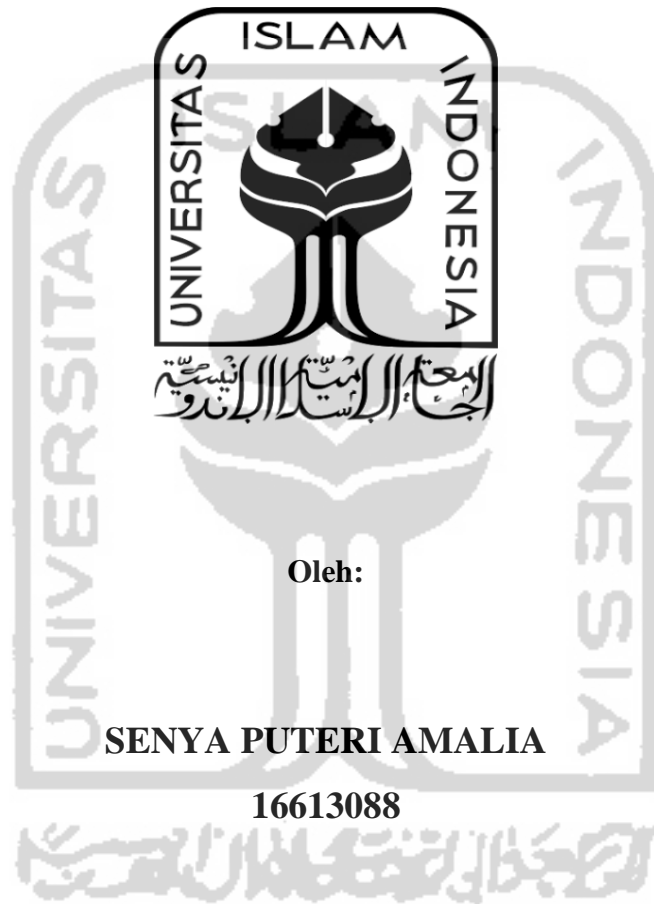


**KAJIAN PERBANDINGAN
ANTARA METODE *IMMUNOASSAY* DAN KCKT
DALAM BIOANALISIS VANKOMISIN UNTUK PKOD**

SKRIPSI



Oleh:

SENYA PUTERI AMALIA

16613088

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JULI 2020**

**KAJIAN PERBANDINGAN
ANTARA METODE *IMMUNOASSAY* DAN KCKT
DALAM BIOANALISIS VANKOMISIN UNTUK PKOD**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam mencapai gelar Sarjana
Farmasi (S.Farm)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh:

SENYA PUTERI AMALIA

16613088

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JULI 2020**

SKRIPSI
**KAJIAN PERBANDINGAN
ANTARA METODE *IMMUNOASSAY* DAN KCKT
DALAM BIOANALISIS VANKOMISIN UNTUK PKOD**



Pembimbing Utama,

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.

(Ari Wibowo, S.Si., M.Sc., Apt.)

Pembimbing Pendamping,

A handwritten signature in black ink, featuring a prominent 'V' at the beginning and several loops.

(Dr. Vitarani D. Ananda N., M.Si., Apt.)

SKRIPSI

**KAJIAN PERBANDINGAN
ANTARA METODE *IMMUNOASSAY* DAN *KCKT*
DALAM BIOANALISIS VANKOMISIN UNTUK PKOD**

Oleh:

SENYA PUTERI AMALIA

16613088

Telah lolos uji etik penelitian dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji
Skripsi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 13 Juli 2020

Ketua Penguji : Dr. Farida Hayati, S.Si., M.Si., Apt. (.....)

Anggota Penguji : Ari Wibowo, S.Si., M.Sc., Apt. (.....)

Dr. Vitarani D. Ananda N., M.Si., Apt. (.....)

Dr. Dwiarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. (.....)

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 13 Juli 2020

Penulis,



Senya Puteri Amalia

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
INTISARI.....	vi
ABSTRACT.....	vii
Pendahuluan	1
Metode.....	3
Analisis Vankomisin Menggunakan Metode <i>Immunoassay</i>	4
Analisis Vankomisin Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi... 9	
Perbandingan Perolehan Hasil antara <i>Immunoassay</i> dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi sebagai Metode Analisis Vankomisin	18
Keselarasan perolehan kadar	18
Perbandingan parameter akurasi dan presisi dari kedua metode.....	19
Perbandingan parameter selektivitas dari kedua metode	19
Perbandingan parameter sensitivitas dari kedua metode.....	24
Perbandingan Efisiensi antara <i>Immunoassay</i> dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi sebagai Metode Analisis Vankomisin	25
Perbandingan waktu yang dibutuhkan dari kedua metode	25
Perbandingan biaya yang dikeluarkan dari kedua metode	27
Kesimpulan	27
Daftar Pustaka	28

KAJIAN PERBANDINGAN ANTARA METODE *IMMUNOASSAY* DAN KCKT DALAM BIOANALISIS VANKOMISIN UNTUK PKOD

Senya Puteri Amalia
Program Studi Farmasi

INTISARI

Vankomisin adalah antibiotik dengan indeks terapi sempit dan variabilitas farmakokinetika *inter-individual* yang tinggi, sehingga penting untuk dipantau dan dikendalikan dengan Pemantauan Kadar Obat dalam Darah (PKOD) agar konsentrasi obat berada pada rentang terapi. Kuantifikasi konsentrasi vankomisin dalam aplikasi PKOD tentunya membutuhkan metode yang akurat dengan keterulangan baik, sehingga mendorong berbagai peneliti mengembangkan metode terbaik. Metode *immunoassay* banyak digunakan dalam aplikasi PKOD karena kecepatan dan kesederhanaan prosedurnya, sedangkan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) mampu memberikan tingkat sensitivitas dan selektivitas yang tinggi dalam bioanalisis vankomisin. Oleh karena itu, kajian ini memberikan tinjauan umum tentang berbagai penelitian terdahulu menggunakan metode *immunoassay* dan KCKT serta perbandingannya untuk mengukur kadar vankomisin dalam cairan biologis manusia, sehingga dapat dijadikan sumber pertimbangan pemilihan metode bioanalisis vankomisin yang tepat, efektif dan efisien dalam aplikasi klinis PKOD. Metode pencarian artikel sebagai referensi dilakukan melalui *database science direct*, *google scholar* dan PubMed dengan kata kunci "*bioanalysis*", "*vancomycin*", "*immunoassay*", "HPLC" dan "*human*" berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Hasil tinjauan dari 34 jurnal ilmiah dalam kajian ini menunjukkan bahwa metode *immunoassay* direkomendasikan untuk PKOD secara rutin, tetapi harus memperhatikan beberapa kondisi pasien. Disisi lain, pasien dengan kondisi khusus yang membutuhkan analisis dengan tingkat sensitivitas dan selektivitas yang tinggi dapat menggunakan metode KCKT, walaupun membutuhkan waktu lebih dan metode yang kompleks.

Kata kunci : vankomisin, *immunoassay*, KCKT, PKOD

COMPARATIVE REVIEW BETWEEN IMMUNOASSAY AND HPLC METHOD IN BIOANALYSIS OF VANCOMYCIN FOR TDM

Senya Puteri Amalia

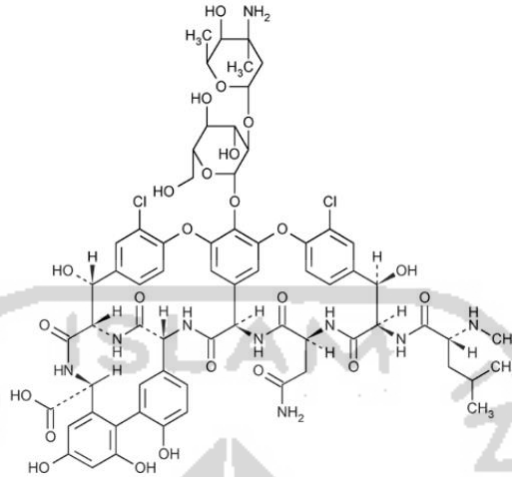
Departement of Pharmacy

ABSTRACT

Vancomycin is an antibiotic with a narrow therapeutic index and high inter-individual pharmacokinetic variability, and it is necessary to be monitored and controlled with Therapeutic Drug Monitoring (TDM) so that the drug concentrations are within the therapeutic range. Quantification of vancomycin concentration in TDM application certainly requires an accurate and precise method, thus encouraging various researchers to develop the best method. The immunoassay method is widely used in TDM applications because the procedure is rapid and straightforward. In contrast, HPLC method can provide a high level of sensitivity and selectivity in vancomycin bioanalysis. Therefore, this study provides a general review of previous studies using the immunoassay and HPLC methods and their comparison to measure the vancomycin concentration in a human biological fluids, as a source of consideration for the selection of vancomycin bioanalysis methods that are appropriate, effective and efficient for the clinical application of TDM. The method of browsing articles as a reference is from the databases from science direct, Google Scholar and PubMed with the keywords “bioanalysis”, “vancomycin”, “immunoassay”, “HPLC” and “human” based on inclusion and exclusion criteria. The results of the study from 34 scientific journals, this study indicates that the immunoassay method is recommended for a routine TDM. Still, it must pay attention to several conditions of the patient. On the other hand, patients with particular conditions that require analysis with a high level of sensitivity and selectivity can use the HPLC method. However, it requires more time and complex processes.

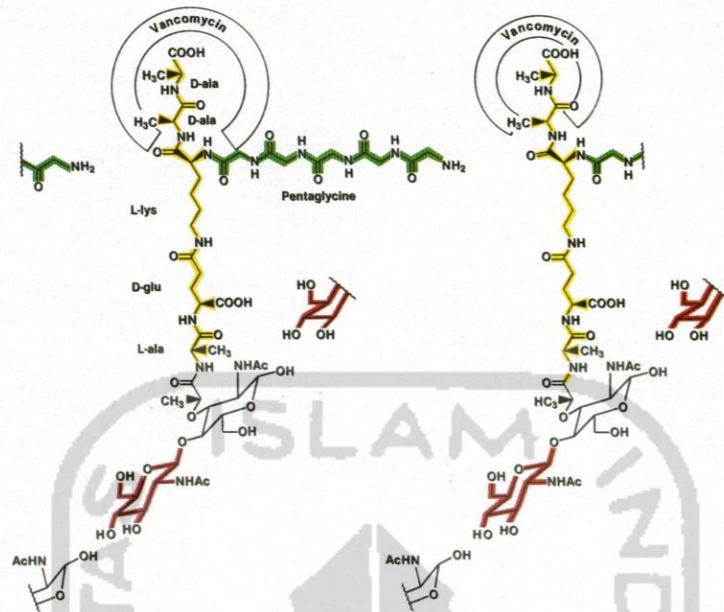
Keyword : vancomycin, immunoassay, HPLC, TDM

Pendahuluan



Gambar 1. Struktur vankomisin (1)

Vankomisin adalah antibiotik trisiklik glikopeptida dengan mekanisme menghambat ikatan antar subunit asam N-asetilmuramat (NAM) and N-asetilglukosamin (NAG) penyusun peptidoglikan, sehingga biosintesis dinding sel bakteri tidak terjadi (**Gambar 2**) (1). Antibiotik ini memiliki aktivitas bakterisidal yang kuat dan bekerja secara *time-dependent* (2–4). Vankomisin bekerja efektif pada spesies bakteri gram positif seperti *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium difficile* dan merupakan lini pertama penanganan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (5). Vankomisin memiliki indeks terapi sempit, yaitu 10-15 mg/L atau 15-20 mg/L untuk infeksi berat seperti MRSA (6). Kadar vankomisin yang melebihi Konsentrasi Toksik Minimal (KTM) berisiko menimbulkan terjadinya nefrotoksitas (kerusakan ginjal) dan ototoksitas (gangguan pendengaran), sedangkan kadar di bawah Konsentrasi Efektif Minimal (KEM) berpotensi menyebabkan resistensi (3,5,7,8). Selain itu, vankomisin memiliki variabilitas farmakokinetika *inter-individual* yang tinggi, sehingga direkomendasikan untuk dilakukan Pemantauan Kadar Obat dalam Darah (PKOD) pada penggunaannya (3,9–11).



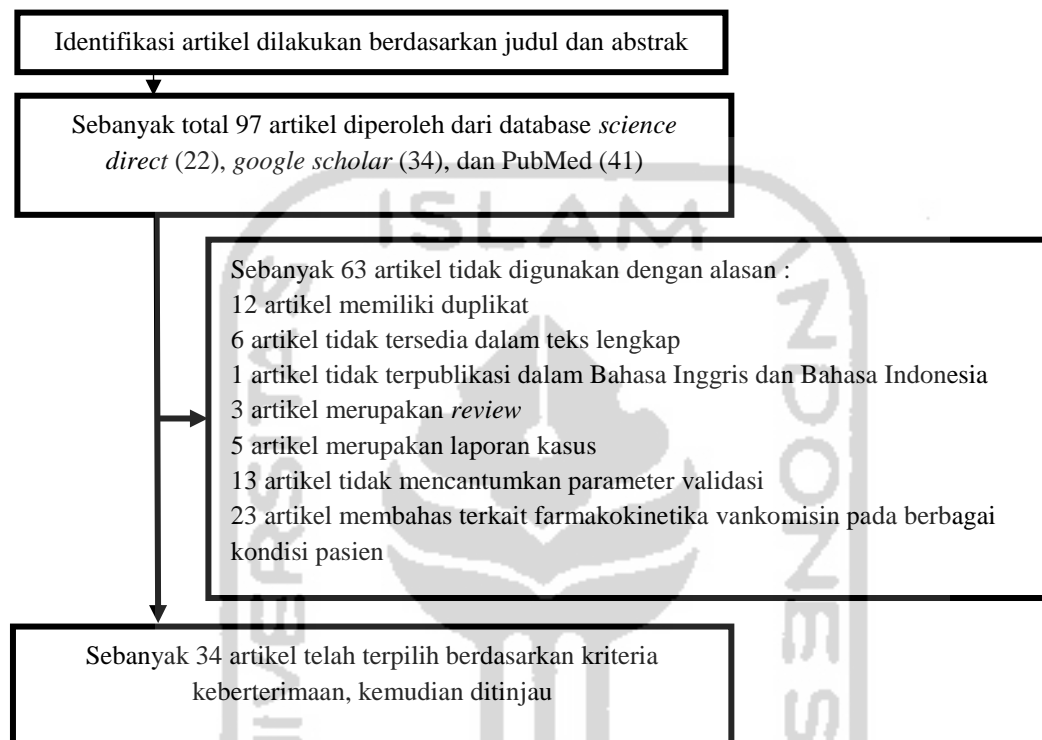
Gambar 2. Mekanisme aksi farmakologi vankomisin (12)

PKOD dilakukan untuk memantau dan mengendalikan konsentrasi vankomisin agar berada dalam kisaran target terapi dan memberikan dosis yang sesuai dengan kebutuhan, sehingga efek terapi yang maksimal dengan minimalnya risiko efek samping dapat tercapai (13). Metode penentuan konsentrasi vankomisin di dalam cairan biologis yang akurat dengan keterulangan baik sangat dibutuhkan dalam aplikasi PKOD. Idealnya, metode analisis yang digunakan memiliki kemampuan membedakan analit dengan metabolitnya, mampu mendeteksi analit dalam konsentrasi kecil, mempunyai prosedur sederhana untuk pengujian rutin, dan tidak dipengaruhi oleh obat lain yang diberikan bersamaan (14). Berbagai penelitian terdahulu telah banyak mengembangkan dan melakukan validasi bioanalisis vankomisin, seperti *immunoassay* (15–22) dan kromatografi cair (23–28). Dua metode tersebut merupakan metode terbanyak yang dikembangkan dengan kelebihan dan kekurangannya masing-masing dalam aplikasi PKOD.

Kajian ini memberikan tinjauan umum hasil rangkuman berbagai jurnal ilmiah yang telah dikembangkan menggunakan metode *immunoassay* dan KCKT, serta perbandingan antar kedua metode untuk penentuan kadar vankomisin di dalam cairan biologis manusia. Fokus utama dan tujuan dilakukannya kajian ini yaitu dapat digunakan sebagai sumber atau bahan pertimbangan dalam penentuan dan

pemilihan teknik bioanalisis yang tepat, efektif dan efisien dalam aplikasi PKOD vankomisin.

Metode

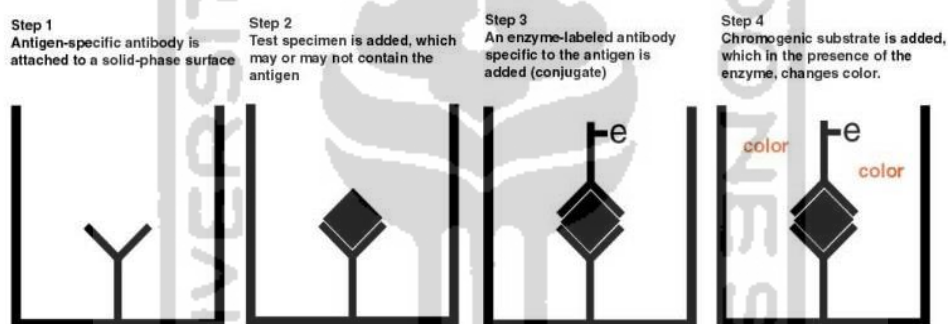


Gambar 3. Skema metode dari kajian

Pencarian referensi dilakukan melalui *database science direct*, *google scholar* dan PubMed menggunakan kata kunci “*bioanalysis*”, “*vancomycin*”, “*immunoassay*”, “*HPLC*” dan “*human*”. Kriteria inklusi dari jurnal ilmiah yang ditentukan yaitu, terpublikasi dalam Bahasa Inggris dan Bahasa Indonesia, merupakan artikel hasil penelitian, memiliki topik penelitian bioanalisis vankomisin menggunakan *immunoassay* dan KCKT, menggunakan sampel cairan biologis manusia, serta membandingkan perolehan antar kedua metode. Kriteria eksklusi artikel yaitu tidak tersedia dalam teks lengkap, artikel berbentuk *review* atau laporan kasus, tidak mencantumkan parameter validasi, dan membahas terkait farmakokinetika vankomisin pada berbagai kondisi pasien. Hasil penyaringan dari identifikasi berdasarkan kriteria yang telah ditentukan menghasilkan 34 artikel yang memenuhi semua persyaratan dan menjadi sumber tinjauan dalam kajian ini.

Analisis Vankomisin Menggunakan Metode *Immunoassay*

Immunoassay merupakan metode bioanalisis secara kualitatif dan kuantitatif yang banyak digunakan dalam diagnosis penyakit, studi farmakokinetik seperti PKOD, kontrol kualitas dan bioekivalensi obat baru pada industri farmasi (29,30). Analisis metode ini didasarkan pada interaksi secara kompetitif maupun non kompetitif antara analit yang berperan sebagai antigen dengan antibodi spesifik (**Gambar 4**) (29). Ikatan antigen-antibodi akan dikenali oleh senyawa penanda seperti radioisotop, enzim, senyawa fluoresens atau senyawa kimia lain (31). Salah satu kelebihan metode *immunoassay* yaitu dapat dilakukan tanpa proses preparasi sampel, sehingga memiliki waktu analisis singkat dengan prosedur yang sederhana (29,31).



Gambar 4. Prinsip analisis dari *immunoassay* (32)

Berbagai teknik metode *immunoassay*, seperti *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (33), *particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay* (PETINIA) (23), *radioimmunoassay* (RIA) (15), *enzyme mediated immunoassay* (EMIT) (17,18,34), FIA (*fluorescence immunoassay*) (35) dan *fluorescence polarization immunoassay* (FPIA) (15,17,18,34,36,37) untuk penentuan konsentrasi vankomisin dalam cairan biologis manusia telah banyak dikembangkan dan diteliti. Penelitian-penelitian terdahulu vankomisin menggunakan *immunoassay* telah terangkum dalam **Tabel 1**.

Metode RIA menggunakan senyawa penanda radioaktif yang sangat berbahaya bagi lingkungan dan kesehatan, terbukti mengalami reaktivitas silang dengan produk degradasi serta membutuhkan waktu dan biaya yang lebih tinggi dibandingkan *immunoassay* lain (31). Seperti metode RIA, FPIA juga mengalami reaktivitas silang, sehingga dapat memberikan nilai bias pada pasien dengan

kerusakan ginjal. Namun metode ini merupakan teknik *immunoassay* yang efisien dan tercepat dengan harga yang terjangkau (15). Disisi lain, metode EMIT perlu meningkatkan presisi metode dengan pengujian metode yang lebih rutin atau modifikasi prosedur analisis yang tentunya akan menurunkan kecepatan dalam analisis (18). Selain itu, metode FPIA dan EMIT tidak menggunakan senyawa yang berbahaya, seperti metode RIA.



Tabel 1. Metode *Immunoassay* untuk Vankomisin dalam Cairan Biologis Manusia

Matriks	Metode	Sensitivitas ($\mu\text{g/mL}$)	% <i>Recovery</i> (%)	Rentang Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Ref
Serum	RIA	-	-	0-64	1,5-4,1	(15)
	FPIA TDx	-	-	0-100	9,5-12,2	
Serum	RIA	-	-	-	-	(19)
	FPIA TDx	0,6	103,2	0,6-100	1,55-4,6	
Serum	FPIA	2	-	-	-	(17)
	EMIT	5	-	-	-	
Serum	FPIA	-	-	-	-	(16)
	EMIT	-	-	-	-	
Serum	Emit	-	95	<30	5,7-8,5	(18)
	FPIA TDx	-	-	-	-	
Serum	FPIA TDx	0,6	-	0,6-100	2-4,6	(37)
Serum (>50 μL)	FPIA TDx	-	103-126	5-100	0,88-2,25 dan 2,81-6,13	(36)
Plasma	PETINIA	2	-	2-50	-	(23)
Serum	ELISA	0,02	91,6-108,8	0,02-5	-	(33)
Eksudat luka			107			
Plasma	FPIA TDx	-	8,4-8,8 (akurasi)	-	8,2-10,4	(38)
Serum	FPIA TDx	-	-	-	1,34-5,36	(39)
Tulang	FPIA TDx	0,6	-	0,6-100	<5	(21)
Tulang (250 mg)	FPIA TDx	1 $\mu\text{g/g}$	-	-	5,5-10	(20)
Plasma, jaringan tubuh, tulang	FPIA TDx	0,1 $\mu\text{g/g}$	-	-	2,3-8,2	(22)
Serum	PETINIA	3	-	3-35	-	(40)
Serum	RIA	-	-	1-32	4,7-11	(35)
	FIA	-	-	0-128	8,9-16,2	
	FPIA	-	-	0-100	0,9-8,1	

Tabel 1. Lanjutan

Matriks	Metode	Sensitivitas (µg/mL)	%Recovery (%)	Rentang Konsentrasi (µg/mL)	CV (%)	Ref
Plasma	FPIA	3	-	3-100	3,1-6,2	(41)
	<i>Homogeneous immunoassay</i>	1,7	-	1,7-80	2,4-4,4	
	<i>Homogeneous immunoassay</i>	5	-	5-100	5,1-6,1	
	PETINIA	0,8	-	0,8-50	2,7-3,9	
Plasma manusia, Serum tikus, <i>Bronchoalveolar Lavage Fluid</i>	RIA	1,7 (BAL)	-	0-80	2,4-4,4	(42)
Plasma, Serum	FPIA TDx	-	-	-	1,1-4,15	(43)
Serum	RIA	-	-	1-32	-	(44)
	FPIA TDx	-	-	0-100	-	

Berbagai penelitian telah membandingkan hubungan antar teknik *immunoassay* yang tersaji pada **Tabel 2**. Metode RIA telah dibandingkan dengan FPIA oleh studi oleh tim Ackerman dan tim Schwenzer yang menunjukkan keselarasan hasil analisis kedua metode, walaupun metode RIA dalam tim Ackerman menentukan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan FPIA (15,19). Selain dengan RIA, Yeo dan tim juga telah membandingkan metode FPIA dengan EMIT, dimana pada konsentrasi vankomisin diatas 30 µg/mL tingkat presisi EMIT tidak diperoleh dengan baik (18). Studi serupa antara EMIT dan FPIA juga tidak menunjukkan perbedaan konsentrasi yang signifikan dengan nilai signifikansi 0,239 dan 0,96 pada tingkat kepercayaan 95% (17). Penelitian Michael dan tim membandingkan FIA (*fluorescence immunoassay*), FPIA dan RIA yang melaporkan bahwa metode RIA dengan FPIA memiliki korelasi yang lebih dekat dibandingkan RIA dengan FIA (35).

Tabel 2. Perbandingan antar metode *immunoassay* untuk vankomisin

Metode	Matriks	Jumlah Sampel	r	Rata-rata Perbedaan	Persamaan	Ref.
RIA vs. FPIA	Serum	123	0,99	0.72 µg/ml	FPIA = 1,01 (RIA) - 0,81	(15)
EMIT vs. FPIA	Serum	84	0,971	12%	FPIA = 0,877 (EMIT) + 0,435	(18)
EMIT vs. FPIA	Serum	10	-	-	-	(17)
RIA vs. FPIA	Serum	98	0,957	-	FPIA = 1,036 (RIA) + 1,66	(19)
RIA vs. FPIA			0,967	-	-	
RIA vs. FIA	Serum	106	0,899	-	-	(35)
FPIA vs. FIA			0,918	-	-	
EMIT vs. FPIA	Serum	50	0,979	(-13)-11%	EMIT = 0,841 (FPIA) + 1,366	(16)

Berbagai perbandingan antar metode *immunoassay* pada studi terdahulu dilakukan menggunakan parameter koefisien korelasi (r) dengan rentang nilai r >0,8. Rentang nilai tersebut di dalam pedoman termasuk ke dalam kategori korelasi kuat hingga sangat kuat (45). Kategori korelasi ini menyebabkan banyak studi tidak

melakukan penentuan rerata perbedaan perolehan kadar antar metode yang dibandingkan, walaupun tiga studi lainnya tetap menentukan dan memperoleh parameter tersebut (15,16,18). Namun seharusnya metode yang digunakan dalam aplikasi PKOD telah terstandar, sehingga mampu memberikan hasil yang serupa dengan metode lainnya.

Pengembangan *immunoassay* tidak hanya dilakukan pada metode analisis, tetapi juga pada sampel yang digunakan. Pengembangan ini sangat berperan penting pada antibiotik risiko tinggi seperti vankomisin yang seharusnya tidak hanya dilakukan pada plasma (23,38) dan serum (15,17,33), tetapi juga harus ditegakkan pada cairan tubuh lainnya. Penegakkan tersebut bertujuan untuk pencegahan infeksi saat operasi dengan memastikan konsentrasi antibiotik dalam plasma dan jaringan target sebelum operasi telah berada di atas batas KEM (22,46). Sehingga mendorong berbagai peneliti yang telah berhasil mengembangkan *immunoassay* pada spesimen tulang (sternum) (20–22), lemak (lemak dinding toraks) (22), dan berbagai jaringan tubuh (22).

Analisis Vankomisin Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah instrumen yang digunakan secara luas untuk analisis secara kualitatif dan kuantitatif berbagai sampel, termasuk obat dalam cairan biologis manusia. Teknik pemisahan metode ini didasarkan pada interaksi antara analit dengan fase diam dan fase gerak (47). Metode ini telah banyak divalidasi dalam berbagai penelitian sebagai aplikasi PKOD vankomisin. Metode dan sistem kromatografi dari beberapa penelitian sebelumnya untuk kuantifikasi vankomisin dalam cairan biologis manusia telah terangkum dalam **Tabel 3**. **Tabel 3** menunjukkan bahwa setiap bagian dari KCKT memiliki peranan dan mampu memberikan dampak dalam analisis KCKT, sehingga perlu untuk dikembangkan.

Seperti fase diam atau kolom yang memegang peranan penting dalam pemisahan analit pada KCKT. Ukuran partikel dari kolom KCKT dapat memberikan pengaruh signifikan pada waktu retensi (t_R) dan jarak puncak.

Semakin kecil ukuran partikel kolom, maka tR analit akan menurun, tetapi tidak menurunkan efisiensi pemisahan (48). Seperti penelitian tim Abu Shandi yang meningkatkan ukuran partikel kolom untuk memperbaiki performa pemisahan (24). Berbeda dengan penelitian Tacio dan tim yang menggunakan ukuran partikel kolom lebih kecil dari umumnya, yaitu 2,7 μm agar dapat mempercepat tR dari vankomisin dan zidovudin sebagai standar internal (SI) (49). Selain itu, vankomisin mengendap pada suasana pH 7, pengendapan ini tentunya sangat berbahaya untuk kolom, karena perolehan puncak yang stabil akan sangat sulit didapatkan (26). Walaupun demikian, tidak terdapat laporan permasalahan puncak vankomisin pada studi tim Rakesh Das dan tim Kees dengan pH dapar 7 dan 6,8 (50,51).

Selain fase diam, fase gerak juga turut berperan dalam proses pemisahan. Kondisi fase gerak dan laju alirnya memberikan pengaruh pada resolusi pemisahan dan tR analit (24,50). Selain itu, semakin cepat laju alir sistem dan lama waktu analisis, maka jumlah fase gerak dan biaya analisis yang dibutuhkan akan meningkat (23). Penelitian Usman dan tim menggunakan laju alir 0,36 mL/menit dengan waktu analisis 12 menit memiliki tingkat *cost-effective* lebih tinggi dibandingkan penelitian yang memilih laju alir 1,5 mL/menit (49) dan 1 mL/menit (52) dengan waktu analisis 8 dan 15 menit. Dari **Tabel 3**, studi dengan nilai *cost-effective* tertinggi dilihat dari laju alirnya dilakukan oleh Zhang dan tim yang memperoleh %*recovery* $\pm 100\%$ dan telah diaplikasikan dalam klinis pada hampir 500 sampel plasma, tulang dan jaringan (53). Disisi lain, pelarut yang digunakan sebagai fase gerak KCKT umumnya bersifat toksik dan berbahaya bagi lingkungan, sehingga pemilihan pelarut yang aman perlu dipertimbangkan (26).

Beragam jenis detektor pada KCKT untuk medeteksi keberadaan vankomisin juga telah banyak dilakukan, seperti detektor UV (23,25,52), DAD (*Diode Array Detector*) (49), FLD (*Fluorescence Detection*) (24), dan MS (*Mass Spechtrometry*) (53,54). **Tabel 3** menunjukkan bahwa detektor UV menjadi pilihan detektor terbanyak yang digunakan, didukung dengan harga yang terjangkau dibandingkan detektor DAD, FLD, dan MS (55). Penelitian tim Khalilian dengan detektor UV memperoleh nilai LoQ (*Limit of Quantification*) 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (25), sedangkan studi menggunakan detektor MS memiliki sensitivitas lebih rendah

dengan LLoQ (*Lower Limit of Quantification*) 0,05 $\mu\text{g/mL}$ (53), dan sensitivitas yang lebih tinggi dengan LoQ 0,005 $\mu\text{g/mL}$ (54). Studi serupa dengan detektor DAD memberikan sensitivitas yang juga lebih rendah dengan LoD (*Limit of Detection*) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (26), dan 1 $\mu\text{g/mL}$ (49). Kuantifikasi vankomisin menggunakan detektor FLD menghasilkan LoQ sebesar 0,005 $\mu\text{g/mL}$ (24). Saat ini, detektor DAD dapat menjadi pilihan dalam pengembangan metode karena penggunaan rentang panjang gelombang (λ) yang luas, yaitu λ UV-Vis (56). **Tabel 3** menunjukkan bahwa %*recovery* antara detektor UV, FLD, dan MS tidaklah berbeda jauh, walaupun memperoleh sensitivitas yang beragam.



Tabel 3. Metode KCKT untuk Vankomisin dalam Cairan Biologis Manusia

Matriks	PS ^{a)}	SI	FD ^{b)}	FG ^{c)}	Detektor	v ^{d)}	tA ^{e)}	LoD ^{u)}	LoQ ^{u)}	LLoQ ^{u)}	%Recovery (%)	CV (%)	Ref
Plasma 200 μ L	PP ^{f)} , ECC ^{g)}	-	C ₁₈ (250 \times 4,6 mm, 5 μ m)	5 mM KH ₂ PO ₄ pH 3: MeOH ^{k)} (80:20), EI ^{s)}	UV 213 nm	1	15	1,56	4,73	3	-	5,97 - 7,73	(52)
Plasma 200 μ L	PP, ECC	-	C ₁₈ (125 \times 4,6 mm, 5 μ m)	50 Mm NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 2,2:ACN ^{l)} (88:12), EI	UV 205 nm	0,36	12	-	-	0,25	91,5 dan 115	\leq 17,8	(23)
Plasma 50 μ L	PP	Zidovudin	C ₁₈ (150 \times 4,6mm, 2,7 μ m)	20 mM AA ^{m)} /AF ⁿ⁾ pH 4: MeOH (88:12), EI	DAD UV 240 nm	1,5	8	-	1	-	95,4-109,5	<11,5	(49)
Plasma 2500 μ L, Urin	PP, SPD E ⁱ⁾	-	C ₁₈ (150 \times 4,6mm ID, 5 μ m)	0,015 M C ₆ H ₁₆ N : ACN (92:2), EI	UV 230 nm	1	-	0,003	0,01	-	87,1 (plasma) dan 92,8 (urin)	1,6-2,1	(25)
Plasma 50 μ L, Tulang 1:5 (w/v), Jar. lemak 1:5 (w/v)	PP	Aminopterin	C ₁₈ (50 \times 2 mm, 5 μ m)	A:0,05% AF dalam air B: MeOH, EG ^{o)}	MS	0,3	6	-	0,05	-	\pm 100	<10	(53)
Plasma 200 μ L, BAL ^{q)} 200 μ L	PP	Kafein	C ₁₈ (150 \times 4,6 mm, 5 μ m)	0,05 M KH ₂ PO ₄ dengan 11% ACN, EI	UV 240 nm	1,2	20	-	-	1	90.8	1,68 - 2,43	(42)
Serum 300 μ L, plasma 300 μ L	U ^{j)}	-	C ₁₈ (100 \times 3 mm, 2,6 μ m)	0,69 M NaH ₂ PO ₄ pH 6,8, EI	-	0,4	-	-	-	0,4	97,4	5	(51)

Tabel 3. Lanjutan

Matriks	PS ^{a)}	SI	FD ^{b)}	FG ^{c)}	Detektor	v ^{d)}	tA ^{e)}	LoD ^{u)}	LoQ ^{u)}	LLoQ ^{u)}	%Recovery (%)	CV (%)	Ref
Plasma, 500 μ L bukan	PP	Imipramin, Nebivolol, Ondansetron, aseklofenak, ibuprofen	C ₁₈ (150 \times 4,6 mm, 4 μ m)	10% ACN dalam 25 mM atau 50 mM KH ₂ PO ₄ pH 7 dan 3,2, EI	UV 229 nm dan 270 nm	1,5	10	-	-	-	99,3-101,1	-	(50)
Plasma 500 μ L	PP	Eritromisin	C ₁₈ (300 \times 4 mm, 10 μ m)	A: 5 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,3 B: MeOH, EG	FLD 225 nm (eksitasi), 228 nm (fluoresensi)	1	27	0,002	0,005	-	96,22-98,78	0,73 6- 6,55 7	(24)
APF ^{f)} dan jar. Paru-paru 1 g	PP	-	C ₁₈ (150 \times 4 mm, 5 μ m)	0,05 M NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 4: ACN (92:8), EI	UV 220 nm	1	10	-	0,1 μ L/mL	-	99,38-101,43	0,62 -7	(27)
Serum 200 μ L	SPE ^{h)}	Atenolol	C ₁₈ (50 \times 3 mm, 3 μ m)	AF 0,1%: ACN (9:1), EI	MS	0,2	5	0,001 μ L/mL	0,005 μ L/mL	-	95,5-100,4	-0,7- 7,2	(54)
Plasma 100 μ L, Mikrodiagnostik	PP	-	C ₁₈ (124 \times 4 mm, 5 μ m)	A: MeOH B: 25 mM KH ₂ PO ₄ pH 2,75, EG	UV 240 nm	1	16	-	-	0,4	86,7 (plsm); 98,3 (μ dialst)	\leq 10, 9	(28)

Tabel 3. Lanjutan

Matriks	PS ^{a)}	SI	FD ^{b)}	FG ^{c)}	Detektor	v ^{d)}	tA ^{e)}	LoD ^{u)}	LoQ ^{u)}	LLoQ ^{u)}	%Recovery (%)	CV (%)	Ref
Plasma 500 μ L, Jar. tubuh dan tulang (100 mg)	SPE	Tinidazole	C ₁₈ (100 \times 4,6 mm, 3 μ m)	A: 5 mM KH ₂ PO ₄ pH 2,8 B: ACN, EG	UV 282 nm	1,5	25	-	-	0,5 μ g/mL	>92,1-97,5	8-20,6	(38)
Plasma dan serum 50 μ L	PP, ECC	Ristosetin	C ₁₈ (250 \times 4,6 mm, 5 μ m)	ACN: 0,02 M NaH ₂ PO ₄ : 0,02 M Na ₂ HPO ₄ (62:14,25: 23,75), EG	UV 225 nm	2	10	0,32	-	-	100,6-103,6	0,97 - 5,83	(43)
Plasma 1000 μ L	PP, ECC	-	C ₁₈ (150 \times 4,6 mm, 5 μ m)	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH 2,8: ACN (90 : 10), EI	UV 229 nm	1	-	0,2	1	-	98,1-116,4	0,3-27,3	(57)
Serum 500 μ L	PP, ECC	-	C ₁₈ (150 \times 4 mm, 5 μ m)	ACN: 0,2 M AA: air (9:10:81) pH 5,4, EI	AUFS 214 nm (lampu zink)	1	14	0,5 atau 0,1	-	-	115	5,8-11,4	(44)
Serum 1000 μ L	PP, ECC	Vitamin B ₁₂	C ₁₈ (220 \times 4,6 mm)	A: NaH ₂ PO ₄ 0,05 M pH 6 B: ACN, EG	UV 235 dan 360 nm	1	33	-	-	-	94	3,4-4,9	(16)
Serum 100 μ L	-	Sefaloridin	C ₁₈ (300 \times 3,9 mm, 10 μ m)	Air: ACN: TEA ^{p)} (870: 130: 4), EI	UV 228 nm	2,5	8	1	-	-	95,6-95,74	0,44 - 4,13	(58)
Serum 500 μ L	SPE, U	Sefuroksim	C ₁₈ (150 \times 4,6 mm)	A: 70 mM C ₂ H ₃ NaO ₂ pH 5 B: ACN: MeOH: AF 0,1% (63:27:10), EG	DAD 280 nm	1	16	-	-	-	98,2-103,9	-	(40)

Tabel 3. Lanjutan

Matriks	PS ^{a)}	SI	FD ^{b)}	FG ^{c)}	Detektor	v ^{d)}	tA ^{e)}	LoD ^{u)}	LoQ ^{u)}	LLoQ ^{u)}	%Recovery (%)	CV (%)	Ref
Serum 1000 µL	-	3-Nitroaniline	C ₁₈	TEA pH 6,2, ACN, THF ^{o)} , EG	DAD 205 nm	1,5	240	1	-		-	5,2	(26)
Serum 500 µL	PP, ECC	-	C ₁₈	14% ACN dalam 0,1 M C ₇ H ₁₆ O ₃ S, EI	UV 210 nm	1	-	-	-		70%	<7	(37)
Serum	SPE	Ristocetin	C ₁₈	-	AUFS 210 nm	-	-	-	-		-	3,1-3,3	(39)
Serum 500 µL	SPE	Ristocetin	C ₁₈ (300 × 3,9 mm, 10 µm)	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH 3,8 -4: ACN (90:10), EI	UV 210 nm	1,5	15	-	-		-	2,4-6,4	(35)

Keterangan

- a) PS : Preparasi sampel
 b) FD : Fase diam
 c) FG : Fase gerak
 d) v : Laju alir (mL/mnt)
 e) tA : waktu analisis
 f) PP : Presipitasi Protein
 g) ECC : Ekstraksi Cair-Cair
 h) SPE : *Solid phase extraction*
 i) SPDE : *Solid Phase Dispersive Extraction*
 j) U : Ultrafiltrasi
 k) MeOH : Metanol

- l) ACN : Asetonitril
 m) AA : Amonium Asetat
 n) AF : Asam Format
 o) THF : Tetrahidrofuran
 p) TEA : Trietilamin
 q) BAL : *Bronchoalveolar Lavage Fluid*
 r) APF : *Artificial perfusion fluid*
 s) EI : Elusi isokratik
 t) EG : Elusi gradien
 u) LoD, LoQ dan LLoQ dalam µg/mL

Perolehan hasil yang didapatkan dari analisis kuantitatif KCKT tentunya harus mengukur kadar seluruh analit dalam sampel dengan tepat, khususnya obat dengan indeks terapi sempit yang dapat berdampak pada interpretasi hasil. Tahapan prosedur preparasi sampel biologis pada KCKT yang panjang dan kompleks serta penggunaan volume dalam jumlah kecil berpotensi besar menyebabkan hilangnya analit (59). Dalam analisis kromatografi, penambahan SI berfungsi sebagai faktor koreksi dan mengkompensasi hilangnya analit dalam proses ekstraksi pada sampel biologis (60). Penggunaan SI dalam studi tim Oyaert berhasil merepresentasikan konsentrasi sebenarnya karena mampu meningkatkan akurasi dan presisi metode (41). Disisi lain, penggunaan SI menyebabkan peningkatan biaya dan waktu dalam pengembangan metode serta analisis (61). Selain itu, senyawa SI banyak dikembangkan menggunakan jenis antibiotik yang sering dikombinasikan dengan vankomisin pada penelitian terdahulu. Hal ini tentunya dapat meningkatkan area atau AUC (*Area Under Curve*) pada puncak SI dari sampel pasien.

Selain kondisi KCKT, tahapan preparasi sampel cairan biologis juga memberikan dampak terhadap hasil analisis. Proses preparasi sampel dilakukan untuk mengeliminasi komponen selain analit yang dapat menjadi pengganggu dalam proses pemisahan KCKT. Pemisahan pengganggu dalam sampel dapat meningkatkan sensitivitas, spesifisitas, akurasi dan presisi, serta mampu memperpanjang masa penggunaan kolom KCKT (2). **Tabel 3 dan Tabel 4** menunjukkan bahwa presipitasi protein merupakan metode yang paling banyak digunakan karena kecepatan dan kemudahan metode, serta rendahnya biaya yang dibutuhkan (49,53).

Efisiensi dari pemisahan dan ekstraksi dapat digambarkan dari nilai perolehan kembali atau *%recovery* dengan nilai keberterimaan $\pm 100\%$, yang mana konsistensi keterulangan perolehan nilai lebih diutamakan (62,63). Keterulangan atau tingkat presisi metode ditunjukkan oleh CV dengan nilai $\pm 15\%$ dan $\pm 20\%$ (LLoQ) (62). Studi oleh Kees berhasil memperoleh *%recovery* sebesar 97,4% dengan CV 5%, sedangkan penelitian lain hanya memperoleh *%recovery* 87,1% dengan nilai CV yang lebih baik yaitu 1,6-2,1% (25,51). Berbeda dengan studi tahun 1995 yang memperoleh *%recovery* 98,1-116,4%, tetapi dengan nilai CV yang

kurang baik, yaitu 0,3-27,3% (57). Menurut pedoman, %*recovery* didapatkan dengan rumus $\frac{\text{konsentrasi analit spiked sampel yang diekstraksi}}{\text{konsentrasi analit dengan spiking setelah sampel diekstraksi}} \times 100$ (62,63). Namun, penelitian lain menghitung %*recovery* dengan cara yang berbeda, yaitu dengan rumus $\frac{\text{konsentrasi analit yang didapatkan}}{\text{konsentrasi teoritis analit}} \times 100$, walaupun pedoman yang mereka acu tidak menyebutkan rumus tersebut (23,27).

Tabel 4. Waktu preparasi sampel pada KCKT

Matriks	Waktu (Menit)					Ref
	Preparasi Sampel					
	PP	ECC	SPE	SPDE	U	
Plasma	11	2	-	-	-	(23)
Plasma, Jaringan tubuh dan Tulang	-	-	-	-	-	(38)
Serum	20	40	-	-	-	(16)
Plasma	11	11	-	-	-	(52)
Plasma, Urin	5	-	-	63	-	(25)
Serum	10,5	-	-	-	-	(49)
Plasma, Jaringan dan Tulang	5	-	-	-	-	(53)
Plasma, Serum, BLAF	10,5	-	-	-	-	(42)
Serum	-	-	-	-	10 (10.000g) atau 20 (1.000g)	(51)
Plasma	15,6	-	-	-	-	(24)
Serum	-	-	>6,5	-	-	(54)
Plasma, Mikrodialisat	15	-	-	-	-	(28)
Plasma, Serum	15	15	-	-	-	(43)
Serum	30	30	-	-	-	(44)
Serum	18	-	-	v	30	(40)

Keterangan :

- a. PP : Pengendapan protein
- b. ECC : Ekstraksi cair-cair
- c. SPE : *Solid phase extraction*
- d. SPDE : *Solid phase dispersive extraction*
- e. U : Ultrafiltrasi

Seperti teknik *immunoassay* yang berhasil dikembangkan pada berbagai jenis spesimen manusia, metode KCKT juga telah banyak dilakukan pada berbagai cairan biologis. Selain macam spesimen yang digunakan, jumlah sampel yang kecil juga dapat memberikan keuntungan dengan mempertimbangkan berbagai

keterbatasan akibat kondisi pasien serta jumlah pelarut dan waktu preparasi sampel yang dibutuhkan, sehingga dapat menurunkan biaya yang dikeluarkan pasien untuk PKOD vankomisin. Beberapa studi mampu mengembangkan bioanalisis vankomisin dengan kebutuhan spesimen sebanyak 50 μ L (43,49,53). Walaupun tentunya pengeluaran biaya analisis tidak hanya dapat dilihat dari poin ini, namun juga dari bagian instrument lainnya.

Perbandingan Perolehan Hasil antara *Immunoassay* dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi sebagai Metode Analisis Vankomisin

Keselarasan perolehan kadar

Beberapa literatur telah menjelaskan masing-masing kelebihan dan kekurangan dari *immunoassay* dan KCKT secara umum dari berbagai aspek. Studi terkait perbandingan metode *immunoassay* dengan KCKT telah terangkum dalam **Tabel 5**. Penelitian terdahulu pada 289 plasma pasien memiliki koefisien korelasi (r) antara KCKT dengan PETINIA yang menunjukkan keselarasan perolehan kadar vankomisin dari kedua metode dengan rerata perbedaan 0,44% (23). Penelitian lain membandingkan metode RIA dengan KCKT yang juga menunjukkan keselarasan korelasi, walaupun perolehan konsentrasi dari metode RIA yang didapatkan lebih besar dibandingkan metode KCKT (42). Korelasi kadar vankomisin antara FPIA dengan KCKT juga telah didapatkan dalam beberapa penelitian (36,38,39).

Semua studi perbandingan perolehan konsentrasi dalam **Tabel 5** memperoleh nilai $r > 0,9$, yang termasuk ke dalam kategori korelasi kuat hingga sangat kuat (45). Namun, selain melihat parameter r , rerata perbedaan perolehan kadar juga penting untuk dipertimbangkan karena perbedaannya yang cukup signifikan (16,37,41). Hal ini tentunya akan berdampak pada interpretasi hasil untuk pasien. Perbedaan signifikan tersebut disebabkan karena beberapa faktor, utamanya terkait dengan kondisi pasien dan karakteristik metode yang digunakan, sehingga mampu memberikan hasil bias pada pembacaan konsentrasi vankomisin pasien,

Perbandingan parameter akurasi dan presisi dari kedua metode

Perolehan akurasi dalam analisis menggambarkan kedekatan konsentrasi yang didapatkan dengan nilai sebenarnya, yaitu pada rentang $\pm 15\%$ atau $\pm 20\%$ (LLoQ) untuk KCKT dan $\pm 20\%$ atau $\pm 25\%$ (LLoQ) untuk *immunoassay* (62,64). Studi Farin dan tim membandingkan akurasi pada KCKT dengan FPIA yang diperoleh sebesar 7,9-20,6% dan 8,4-8,8% (38). Namun, studi lain berhasil mendapatkan akurasi KCKT yang lebih baik dan berada pada rentang keberterimaan, yaitu 0,222-1,667% (24), $\leq 5,23\%$ (42) dan (-6,7)-11,5 (28). Seperti halnya akurasi, perolehan *%recovery* pada *immunoassay* tidak menggambarkan efisiensi ekstraksi seperti KCKT, melainkan kedekatan hasil yang diperoleh. Beberapa penelitian terdahulu telah memperoleh *%recovery* FPIA sebesar 103,2% (19) dan 103-126% (36), EMIT sebesar 95% (18) dan ELISA sebesar 91-108,8% (33). Sayangnya, penentuan akurasi dan *%recovery* dalam studi *immunoassay* tidak banyak dilakukan seperti halnya KCKT, dimana pada dasarnya parameter ini sangat penting untuk mengetahui kemampuan metode analisis. Namun, dari beberapa studi tersebut dapat dilihat bahwa perolehan akurasi antara metode KCKT dan *immunoassay* tidaklah berbeda jauh.

Presisi atau nilai CV dari kedua metode juga menjadi poin kritis dan penting untuk dibandingkan. Penelitian tim Pfaller membandingkan metode KCKT, RIA, FIA dan FPIA dengan nilai CV 2,4-9,6%, 4,7-11%, 8,9-16,2% dan 0,9-8,1% (35). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa KCKT bukanlah metode dengan tingkat presisi tertinggi diantara metode lainnya, melainkan FPIA (35). Berbagai studi serupa juga memperoleh nilai presisi FPIA yang lebih rendah dan mendukung bahwa FPIA memiliki keterulangan yang lebih baik dibandingkan KCKT (37–39,43). Disisi lain, tingkat presisi dari KCKT lebih tinggi jika dibandingkan metode RIA dan FIA, seperti pada studi yang mendapatkan CV sebesar 1,68-2,43% untuk KCKT dan 2,4-4,4% untuk RIA (42).

Perbandingan parameter selektivitas dari kedua metode

Metode yang digunakan dalam aplikasi PKOD harus memiliki selektivitas untuk mampu membedakan analit dengan metabolit atau senyawa lainnya. Selektivitas tersebut memegang peranan penting, mengingat penggunaan klinis

pasien yang tidak hanya menerima vankomisin sebagai monoterapi, tetapi juga dikombinasi dengan antibiotik atau obat lain. Namun, terdapat laporan kasus PKOD vankomisin seperti PETINIA (Beckman Coulter) pada dua pasien dengan kondisi IgM yang tinggi. Metode tersebut tidak mampu mengukur konsentrasi vankomisin pasien dengan tepat dan mengalami peningkatan laju agregasi partikel yang tidak normal, sehingga memberikan hasil rendah yang palsu (65). Laporan kasus lainnya terjadi pada dua pasien dengan kondisi serupa menggunakan PETINIA (Beckman Coulter) dan perolehan kadar vankomisin yang tidak selaras dengan dosis yang diberikan (66). Penyebab hasil bias kedua laporan kasus telah dijelaskan dalam studi *in vitro* yang mengidentifikasi pengaruh paraprotein (immunoglobulin) pada empat teknik *immunoassay* vankomisin, dimana Ig M yang tinggi menurunkan perolehan kadar vankomisin pada PETINIA (67).

Selain PETINIA, metode FPIA juga mengalami reaktivitas silang, walaupun menjadi metode yang paling banyak digunakan pada berbagai institusi. Reaktivitas silang tersebut menyebabkan perolehan konsentrasi vankomisin yang lebih tinggi dibandingkan konsentrasi sebenarnya pada pasien dengan kerusakan ginjal (16–18,34,37). Reaktivitas silang terjadi dengan produk degradasi vankomisin, yaitu *crystalline degradation product* (CDP-1) yang umumnya terakumulasi dalam ginjal pasien yang rusak (16,18,34). Namun pada pasien dengan fungsi ginjal normal, analisis FPIA terbukti tidak memiliki perbedaan kadar secara signifikan ketika dibandingkan dengan EMIT dan KCKT. *Immunoassay* dengan antibodi poliklonal seperti FPIA dan RIA terbukti mampu mengenali keberadaan CDP-1 sehingga memberikan hasil yang bias, sedangkan metode EMIT dengan antibodi monoklonal tidak menunjukkan terjadinya reaktivitas silang (16,17,34).

Berbeda dengan studi sebelumnya, dua laporan kasus membuktikan bahwa EMIT mengalami reaktivitas silang, yaitu pengukuran konsentrasi vankomisin yang berlebih (>50%) ketika dibandingkan dengan KCKT (68), dan perolehan kadar pada pasien yang belum mendapatkan vankomisin sebelumnya (69). Reaktivitas silang ini menunjukkan bahwa *immunoassay* memiliki selektivitas yang rendah, sedangkan KCKT mampu memisahkan vankomisin dengan produk

degradasi dan jenis obat lainnya (34). Seperti pada penelitian Usman dan tim yang menguji selektivitas KCKT menggunakan meropenem dan imipenem (23), serta obat lainnya (28,49,57) yang terbukti mampu terpisah dengan puncak vankomisin. Uji selektivitas lainnya oleh tim Jehl langsung melakukan pada 112 serum pasien yang mendapatkan beragam kombinasi obat dan terbukti tidak mempengaruhi hasil analisis vankomisin pada KCKT (44). Selektivitas yang tinggi ini menjadi salah satu kelebihan dari metode KCKT. Selain itu, KCKT juga mampu membedakan dan menentukan kadar lebih dari satu analit di dalam sampel.



Tabel 5. Perbandingan metode *immunoassay* dengan KCKT dalam penentuan kadar vankomisin

Metode	Matriks	Jumlah Sampel	r	Rata-rata Perbedaan	Persamaan	Senyawa <i>Crossreactivity</i>	Ref.
KCKT vs. PETINIA	Plasma	289	0,947	0,44%	KCKT = 0,949 (PETINIA) + 0,554	-	(23)
KCKT vs. FPIA	Serum	64	FPIA laboratorium penelitian : 0,94;	-	FPIA = 1,025(KCKT)+2,438	-	(43)
			FPIA laboratorium private : 0,943	-	FPIA = 1,046(KCKT)+1,236	-	
KCKT vs. RIA	Serum	112	0,945	2,30 ± 2,85 µg/mL	RIA = 1,13 (KCKT) + 2,32	-	(44)
KCKT vs. FPIA			0,967	1,92 ± 2,01 µg/mL	FPIA = 1,11 (KCKT) + 2,06	-	
KCKT vs. FPIA TDx	Darah	180	0,964	-	FPIA = -0,84 (KCKT) + 1,04	-	(38)
	Jaringan dan tulang	270					
FPIA vs. KCKT	Serum	9	-	13,4-52,6%	-	V*	(37)
FPIA vs. KCKT	Serum	60	0,97	-	FPIA = 0,84557 (KCKT) + 3,3205	-	(36)
FPI vs. KCKT	Serum	50	0,939	16-25%	FPIA = 1,148 (KCKT) + 0,507	CDP-1 atau demetilvankomisin	(16)
EMIT vs. KCKT			0,933	-0,4-34%	EMIT = 0,958(KCKT) + 1,924		
FPIA vs. KCKT	Serum	98	0,98	-	FPIA = 1,09(KCKT) + 3,04	-	(19)
FPIA vs. KCKT	Serum	100	0,9996	-	FPIA = 1,0489 (KCKT) - 0,737	-	(39)
PETINIA vs. KCKT	Serum	8	0,960 (r ²)	-	KCKT = 0,78 (PETINIA) + 1,35 (van bebas)	-	(40)
FPIA vs. KCKT			0,955 (r ²)	-	KCKT = 0,82 (PETINIA) - 1,61 (total van)	-	
EMIT vs. KCKT	Serum	50	0,963	-	EMIT = 0,51 + 1 (KCKT)	-	(58)

Tabel 5. Lanjutan

Metode	Matriks	Jumlah Sampel	r	Rata-rata Perbedaan	Persamaan	Senyawa <i>Crossreactivity</i>	Ref.
FIA vs. KCKT	Serum	106	0,919	-	EMIT = 0,51 + (KCKT)	-	(35)
FPIA vs. KCKT			0,977		FPIA = 0,877(KCKT) + 0,819	-	
RIA vs. KCKT			0,964		FIA = 0,899 (KCKT) + 0,539	-	
FPIA vs. KCKT	Plasma	98	0,97	12,20%	KCKT = 1,04 FPIA + 0,15	-	(41)
<i>Immunoassay</i> vs. KCKT		99	0,98	22,20%	KCKT = 1,22 <i>immunoassay</i> - 0,27		
<i>Immunoassay</i> vs. KCKT			0,98	8,10%	KCKT = 0,93 <i>immunoassay</i> + 1,37		
PETINIA vs. KCKT		98	0,97	6,10%	KCKT = 0,99 <i>immunoassay</i> + 0,45		
RIA vs. KCKT	Plasma	62	0,916	-	KCKT = 0,651 (RIA) + 3,98	-	(42)
			0,973	-	KCKT = 0,859 (RIA) + 0,766		

Keterangan :

* : mengalami *crossreactivity*, namun tidak disebutkan

Perbandingan parameter sensitivitas dari kedua metode

Studi bioanalisis vankomisin dalam serum antara metode EMIT dan FPIA yang memperoleh nilai LoQ (*Limit of Quantification*) sebagai batas kuantifikasi sebesar 5 dan 2 µg/mL, (17). Namun, penelitian lainnya mampu memperoleh sensitivitas FPIA yang lebih rendah pada spesimen serum dan tulang, yaitu 0,6 µg/mL (19,21,37). Selain itu, tingkat sensitivitas dari RIA pada penelitian lain masih belum mampu menyaingi sensitivitas FPIA dengan LoD (*Limit of Detection*) sebagai batas deteksi sebesar 1,7 µg/mL pada cairan *Bronchoalveolar Lavage* (BAL) (42). Perolehan sensitivitas dari ELISA sebesar 0,02 µg/mL mampu menjadi nilai sensitivitas terendah dibandingkan metode lain dalam **Tabel 1** pada serum dan eksudat luka, walaupun pengujian selektivitas metode hanya dilakukan pada gentamisin (33). Penelitian lain oleh Michael dan tim membandingkan FIA, FPIA dan RIA, dimana metode RIA membutuhkan tambahan pengenceran sampel pada konsentrasi vankomisin ≥ 32 µg/mL (35).

Studi lainnya telah berhasil membandingkan tingkat sensitivitas antara metode *immunoassay* dengan KCKT. Seperti studi oleh Usman dan tim yang menunjukkan bahwa KCKT terbukti 8 kali lebih sensitif dibandingkan PETINIA dengan perbandingan LLoQ sebesar 0,25 µg/mL terhadap 2 µg/mL (23). Perbandingan serupa oleh Berthoin dan rekan juga memperoleh nilai LLoQ KCKT yang lebih rendah yaitu 1,6 dan 0,3 µg/mL, sedangkan PETINIA sebesar 3 µg/mL. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa KCKT mampu melakukan analisis pada konsentrasi yang lebih tinggi hingga 300 µg/mL, dimana PETINIA hanya mampu mengkuantifikasi hingga kadar 35 µg/mL (40). Studi berbeda mendapatkan bahwa FPIA memiliki rentang analisis yang lebih luas dibandingkan dengan KCKT dan RIA, yaitu 1-32 µg/mL, 0-100 µg/mL dan 1-50 µg/mL untuk RIA, FPIA dan KCKT (44).

Dari beragam studi perbandingan langsung antara KCKT dengan *immunoassay*, hampir keseluruhan studi menunjukkan bahwa KCKT merupakan metode yang lebih sensitif dibandingkan *immunoassay*. Parameter sensitivitas dari metode yang digunakan dalam aplikasi PKOD juga tentunya akan memberikan keuntungan untuk kondisi pasien dengan konsentrasi vankomisin yang berada di

bawah rentang KEM (subdosis) atau kondisi yang membutuhkan tingkat sensitivitas tinggi. Namun, selama metode bioanalisis mampu memiliki rentang kuantifikasi pada konsentrasi terapi vankomisin, maka aplikasi tersebut sudah cukup untuk dapat digunakan dalam aplikasi PKOD. Berbeda halnya jika aplikasi metode tersebut bertujuan untuk bidang lainnya, seperti bidang industri atau penelitian yang tentunya membutuhkan tingkat sensitivitas metode analisis yang tinggi.

Perbandingan Efisiensi antara *Immunoassay* dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi sebagai Metode Analisis Vankomisin

Perbandingan waktu yang dibutuhkan dari kedua metode

KCKT membutuhkan waktu analisis yang panjang, sedangkan metode *immunoassay* mampu melakukan dengan lebih cepat dan mudah (70,71). Studi terdahulu melakukan perbandingan waktu analisis vankomisin, dimana KCKT membutuhkan 15 menit, sedangkan FPIA hanya memerlukan 5 menit setiap analisis, bahkan setiap jamnya mampu menguji hingga 80 sampel (35). Studi tersebut juga menunjukkan bahwa waktu analisis FPIA tersebut lebih pendek dibandingkan dengan RIA. Kecepatan tersebut disebabkan berbagai tahapan *immunoassay* seperti pengenceran sampel, pembacaan dan perhitungan dilakukan secara otomatis, serta mampu membaca sampel dengan jumlah banyak dalam satu kali analisis (14,35,36). Walaupun demikian, pengujian (proses pencampuran, inkubasi) metode ELISA dilakukan secara manual serta dapat dilihat bahwa **Tabel 4** dan **Tabel 6** menunjukkan bahwa total waktu beberapa metode KCKT lebih singkat. Namun, metode ELISA tersebut dapat dilakukan langsung pada 96 sampel, sehingga efisiensi waktu yang dimiliki ELISA tentunya menjadi lebih tinggi. Studi lain juga menunjukkan bahwa total waktu analisis yang dibutuhkan KCKT adalah 4 kali dari waktu yang diperlukan metode RIA dan FPIA (44).

Berdasarkan penjabaran sebelumnya, metode *immunoassay* memiliki prosedur yang lebih sederhana dan waktu analisis yang cepat dibandingkan teknik KCKT. Hal tersebut memberikan keuntungan dalam aplikasi PKOD vankomisin di klinis untuk memberikan hasil yang cepat agar tindakan dapat segera diberikan pada pasien. Disisi lain, dalam pelaksanaan KCKT mengharuskan rangkaian prosedur

yang panjang, yaitu mulai dari pengondisian sistem KCKT, preparasi sampel dan waktu analisis yang lama serta dibutuhkannya pencucian kolom pada saat analisis dua analit yang berbeda ataupun saat instrumen telah selesai digunakan (36,58). Dalam hal ini memberikan kemungkinan variasi disetiap tahapannya, seperti variasi pada proses penyiapan larutan fase gerak, ekstraksi sampel dan lainnya (36). Sebaliknya, *immunoassay* tidak memerlukan tahapan preparasi sampel, selain itu analisis dapat dilakukan dalam jumlah sampel yang banyak sekaligus (14,70).

Tabel 6. Waktu yang dibutuhkan *immunoassay*

Metode	Matriks	Kons. Standar	Waktu (mnt)			tP (bln)	Ref
			PS	P	A		
ELISA	-	0-40,5 ng/mL	-	64	5	12	(72)
ELISA	Serum Urin	12,8-1000 ng/mL	65 5	92	5	12 dan 1*	(73)
EMIT	Serum, plasma	0-50 µg/mL	-	-	-	**	(74)
PETINIA	Serum, plasma	2,5-100 µg/mL	-	-	-	**	(75)
FPIA	Serum, plasma	2,5-100 µg/mL	-	-	-	3*	(76)
LTIA	Serum, plasma	2,5-100 µg/mL	-	5	3	12	(77)

Keterangan

* : Ketika kit sudah terbuka

** : Sesuai label

PS : Preparasi sampel

P : Pengujian

A : Analisis

tP : Waktu penyimpanan

Namun, tidak hanya faktor kecepatan yang dibutuhkan dalam PKOD, melainkan faktor lain seperti keakuratan dan ketepatan analisis diperlukan agar interpretasi data dan tindak lanjut pilihan terapi pasien dapat diberikan dengan tepat dan sesuai. Walaupun perolehan korelasi hasil antar kedua metode selaras dan tingkat akurasi serta presisi yang tidak berbeda jauh. Pada beberapa kondisi, seperti risiko terjadinya reaktivitas silang serta kebutuhan sensitivitas yang tinggi pada pasien dengan kadar vankomisin rendah menjadi kekurangan metode *immunoassay*. Pada beberapa kasus yang telah disebutkan sebelumnya, reaktivitas silang menjadi permasalahan utama dari *immunoassay* terhadap beberapa produk degradasi dan senyawa. Berbeda dengan metode KCKT yang memiliki tingkat sensitivitas dan selektivitas lebih tinggi, dimana hal ini telah dibuktikan dalam beberapa penelitian. Selain itu, KCKT juga mampu membedakan dan menentukan kadar lebih dari satu analit di dalam sampel.

Perbandingan biaya yang dikeluarkan dari kedua metode

Dari sisi biaya, investasi awal yang dibutuhkan KCKT lebih tinggi jika dibandingkan dengan *immunoassay*. Selain itu, proses pengoperasian instrumen KCKT yang kompleks memerlukan teknisi ahli dalam menjalankannya. Namun, reagen atau kit pada *immunoassay* memiliki jangka penggunaan yang pendek setelah kit terbuka (**Tabel 6**), sehingga penggunaannya perlu menyesuaikan dengan kebutuhan PKOD yang dilakukan, mengingat implementasi PKOD di Indonesia masih sangat minim dan jarang dilakukan (70). Selain itu, penelitian lain menunjukkan bahwa biaya kebutuhan alat dan bahan metode KCKT dengan teknik elusi isokratik lebih rendah dibandingkan metode *immunoassay* (42). Dari beberapa penelitian tersebut, dapat dilihat bahwa KCKT memerlukan biaya investasi awal yang lebih tinggi, tetapi dalam pelaksanaan selanjutnya biaya kebutuhan analisis KCKT lebih rendah. Semakin tingginya biaya analisis yang dikeluarkan, maka harga yang dibayarkan oleh pasien pun akan semakin meningkat. Walaupun demikian, biaya yang dikeluarkan oleh pasien dapat ditekan ketika kebutuhan analisis atau PKOD pasien semakin tinggi (70).

Kesimpulan

Dalam praktik klinis PKOD vankomisin, kedua metode yang dibahas dalam artikel ini memiliki kemampuan analisis yang sama baiknya dan korelasi yang selaras dalam menggambarkan konsentrasi vankomisin, walaupun dengan presisi dan tingkat selektivitas serta sensitivitas yang berbeda. Kajian ini tidak menentukan metode terbaik atau metode yang dapat menjadi pilihan utama, melainkan memberikan rekomendasi pertimbangan terhadap beberapa faktor yang perlu diperhatikan ketika salah satu metode menjadi pilihan dalam penentuan kadar vankomisin pasien. Metode *immunoassay* dapat menjadi pilihan yang direkomendasikan jika analisis diperlukan cepat dan digunakan sebagai analisis rutin, tetapi pada beberapa kondisi pasien seperti pasien dengan kerusakan ginjal dan nilai imunoglobulin yang tinggi harus dihindari. Di sisi lain, metode KCKT direkomendasikan pada analisis spesimen pasien yang memerlukan tingkat sensitivitas dan selektivitas metode tinggi serta dapat digunakan tanpa perlu

mempertimbangkan kondisi pasien, tetapi tidak dapat memberikan metode yang cepat dan mudah.

Daftar Pustaka

1. U.S. Pharmacopeia. The United States Pharmacopeia, USP 30, The National Formulary , NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2007.
2. Javorska L, Krcmova LK, Solichova D, Solich P, Kaska M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography - A review. *J Sep Sci*. 2016;39(1):6–20.
3. Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, Moellering RC, Craig WA, Billeter M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adults: Summary of consensus recommendations from the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2009;29(11):1275–9.
4. Türkan F, Atalar MN. The Effects of Amoxicillin and Vancomycin Hydrochloride Hydrate on Glutathione S-Transferase Enzyme Activity : An in vitro study Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi Üzerine Amoksilin ve Vankomisin Hidroklorid Hidratın Etkisi: Bir in vitro çalışma. *2018;8(2):141–8*.
5. Brozmanová H, Kacířová I, Uřinová R, Šišťík P, Grundmann M. New liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine TDM of vancomycin in patients with both normal and impaired renal functions and comparison with results of polarization fluoroimmunoassay in light of varying creatinine concentrations. *Clin Chim Acta*. 2017;469(February):136–43.
6. Joint Formulary Committee. British National Formulary. 69th ed. London: British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; 2015.
7. Forouzesh A, Moise PA, Sakoulas G. Vancomycin ototoxicity: A reevaluation in an era of increasing doses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):483–6.
8. Van Hal SJ, Paterson DL, Lodise TP. Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):734–44.
9. Levitus M, Perera TB. Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) [Internet]. StatPearls Publishing; 2018. Available from: <https://europepmc.org/article/med/30020605>
10. Martin JH, Norris R, Barras M, Roberts J, Morris R, Doogue M, et al. Therapeutic Monitoring of Vancomycin in Adult Patients: A Consensus Review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clin Biochem Rev*. 2010;31.
11. Monteiro JF, Hahn SR, Gonçalves J, Fresco P. Vancomycin therapeutic drug

- monitoring and population pharmacokinetic models in special patient subpopulations. *Pharmacol Res Perspect*. 2018;6(4).
12. Nagarajan R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(4):605–9.
 13. Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean J Intern Med*. 2009;24(1):1–10.
 14. Hazarika I. Therapeutic Drug Monitoring (TDM): An Aspect of Clinical Pharmacology and Pharmacy Practice. *Res Rev A J Pharmacol [Internet]*. 2015;(May):27–34. Available from: www.stmjournals.com
 15. Ackerman BH, Berg HG, Strate RG, Rotschafer JC. Comparison of radioimmunoassay and fluorescent polarization immunoassay for quantitative determination of vancomycin concentrations in serum. *J Clin Microbiol*. 1983;18(4):994–5.
 16. Hu MW, Anne L, Forni T, Gottwald K. Measurement of vancomycin in renally impaired patient samples using a new high-performance liquid chromatography method with vitamin B12 internal standard: Comparison of high-performance liquid chromatography, emit, and fluorescence polarization immunoass. *Ther Drug Monit*. 1990;12(6):562–9.
 17. Sym D, Smith C, Meenan G, Lehrer M. Fluorescence polarization immunoassay: Can it result in an overestimation of vancomycin in patients not suffering from renal failure? *Ther Drug Monit*. 2001;23(4):441–4.
 18. Yeo KT, Traverse W, Horowitz GL. Clinical performance of the EMIT vancomycin assay. *Clin Chem*. 1989;35(7):1504–7.
 19. Schwenzer KS, Wang CHJ, Anhalt JP. Automated fluorescence polarization immunoassay for monitoring vancomycin. Vol. 5, *Therapeutic Drug Monitoring*. 1983. p. 341–5.
 20. Massias L, Dubois C, De Lentdecker P, Brodaty O, Fischler M, Farinotti R. Penetration of vancomycin in uninfected sternal bone. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(11):2539–41.
 21. Graziani AL, Lawson LA, Gibson GA, Steinberg MA, McGregor RR. Vancomycin concentrations in infected and noninfected human bone. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(9):1320–2.
 22. Martin C, Alaya M, Mallet MN, Viviani X, Ennabli K, Said R, et al. Penetration of vancomycin into mediastinal and cardiac tissues in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(2):396–9.
 23. Usman M, Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA). *Springerplus*. 2016;5(1):1–7.
 24. Abu-Shandi KH. Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*. 2009;395(2):527–32.
 25. Khalilian F, Hanzaki SA, Yousefi M. Synthesis of a graphene-based nanocomposite for the dispersive solid-phase extraction of vancomycin from biological samples. *J Sep Sci*. 2015;38(6):975–81.
 26. Ghassempour A, Darbandi MK, Asghari FS. Comparison of pyrolysis-mass spectrometry with high performance liquid chromatography for the analysis

- of vancomycin in serum. *Talanta*. 2001;55(3):573–80.
27. Jesús Valle MJ de, López FG, Navarro AS. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(3):835–9.
 28. Plock N, Buerger C, Kloft C. Successful management of discovered pH dependence in vancomycin recovery studies: Novel HPLC method for microdialysis and plasma samples. *Biomed Chromatogr*. 2005;19(3):237–44.
 29. Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, Desilva BS, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: A pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;21(6):1249–73.
 30. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W. Enzyme - linked immunosorbent assay for the quantitative / qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med [Internet]*. 2018;72(1):32–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>
 31. Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *Int J Biomed Sci [Internet]*. 2006;2(3):217–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674985> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3614608>
 32. Texas Health and Human Services. Enzyme Immunoassays (EIA) Laboratory Services Section [Internet]. 2010 [cited 2020 Jul 17]. Available from: https://www.dshs.state.tx.us/lab/serology_eia.shtm
 33. Odekerken JCE, Logister DMW, Assabre L, Arts JJC, Walenkamp GHIM, Welting TJM. ELISA-based detection of gentamicin and vancomycin in protein-containing samples. *Springerplus*. 2015;4(1).
 34. Anne L, Hu M, Chan K, Colin L, Gottwald K. Potential problem with fluorescence polarization immunoassay cross-reactivity to vancomycin degradation product CDP-1: its detection in sera of renally impaired patients. *Ther Drug Monit [Internet]*. 1989 Sep;11(5):585–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683253>
 35. Pfaller MA, Krogstad DJ, Granich GG, Murray PR. Laboratory evaluation of five assay methods for vancomycin: Bioassay, high-pressure liquid chromatography, fluorescence polarization immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence immunoassay. *J Clin Microbiol*. 1984;20(3):311–6.
 36. Filburn BH, Shull VH, Tempera YM, Dick JD. Evaluation of an automated fluorescence polarization immunoassay for vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983;24(2):216–20.
 37. Morse GD, Nairn DK, Bertino JS, Walshe JJ. Overestimation of vancomycin concentrations utilizing fluorescence polarization immunoassay in patients on peritoneal dialysis. *Ther Drug Monit*. 1987;9(2).
 38. Farin D, Piva GA, Gozlan I, Kitzes-Cohen R. A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX). *J Pharm Biomed Anal*. 1998;18(3):367–72.
 39. Ristuccia PA, Ristuccia AM, Bidanset JH, Cunha BA. Comparison of

- Bioassay, High-Performance Liquid Chromatography, and Fluorescence Polarization Immunoassay for Quantitative Determination of Vancomycin in Serum. *Ther Drug Monit* [Internet]. 1984 Jun;6(2):238–42. Available from: <http://journals.lww.com/00007691-198406000-00019>
40. Berthoin K, Ampe E, Tulkens PM, Carryn S. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(6):555–60.
 41. Oyaert M, Peersman N, Kieffer D, Deiteren K, Smits A, Allegaert K, et al. Novel LC-MS/MS method for plasma vancomycin: Comparison with immunoassays and clinical impact. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015;441:63–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.012>
 42. Hagihara M, Sutherland C, Nicolau DP. Development of HPLC methods for the determination of vancomycin in human plasma, mouse serum and bronchoalveolar lavage fluid. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(3):201–7.
 43. Li L, Miles M V., Hall W, Carson SW. An Improved Micromethod for Vancomycin Determination by High-Performance Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit* [Internet]. 1995 Aug;17(4):366–70. Available from: <http://journals.lww.com/00007691-199508000-00009>
 44. Jehl F, Gallion C, Thierry RC, Monteil H. Determination of vancomycin in human serum by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(4):503–7.
 45. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish J Emerg Med*. 2018;18(3):91–3.
 46. Stone HH. Basic principles in the use of prophylactic antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1984;14(suppl B):33–7.
 47. U.S. Pharmacopeia. The United States Pharmacopeia, USP 32, The National Formulary , NF 22. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009.
 48. Lanças FM. Estratégias para diminuição do tempo de análise em Cromatografia Líquida Moderna. *Sci Chromatogr* [Internet]. 2009;1(4):39–47. Available from: <http://scientiachromatographica.com/files/v1n4/v1n4a4.pdf>
 49. Lima TDM, Seba KS, Gonçalves JCS, Cardoso FLL, Estrela RDCE. A Rapid and Simple HPLC Method for Therapeutic Monitoring of Vancomycin. *J Chromatogr Sci*. 2018;56(2):115–21.
 50. Das R, Pal TK, Nandy BC, Duttagupta S. Development of method of analysis for estimating the Vancomycin in blood plasma by RP-HPLC method: Application to in vivo Studies. *Der Pharm Lett*. 2011;2(4):201–10.
 51. Kees MG, Wicha SG, Seefeld A, Kees F, Kloft C. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. *J Clin Pharmacol*. 2014;54(3):318–23.
 52. Wibowo A, Maulidina DI, Fitri WS, Dwi V. Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Spiked - plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - detektor UV untuk Aplikasi Pemantauan Kadar Obat dalam Darah. *Eksakta J Ilmu-Ilmu MIPA*. 2019;19(1):35–45.
 53. Zhang M. Determination of Vancomycin in Human Plasma, Bone and Fat

- by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Bioanal Tech.* 2014;5(3).
54. Zhang T, Watson DG, Azike C, Tettey JNA, Stearns AT, Binning AR, et al. Determination of vancomycin in serum by liquid chromatography-high resolution full scan mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2007;857(2):352–6.
 55. Zhong W, Que Hee SS. Comparison of UV, fluorescence, and electrochemical detectors for the analysis of formaldehyde-induced DNA adducts. *J Anal Toxicol.* 2005;29(3):182–7.
 56. Swartz M. HPLC detectors: A brief review. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2010;33(9–12):1130–50.
 57. Lukša J, Marušič A. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1995;667(2):277–81.
 58. Demotes-Mainard F, Labat L, Vingon G, Bannwarth B. Column-Switching High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Vancomycin in Serum. *Ther Drug Monit [Internet].* 1994 Jun;16(3):293–7. Available from: <http://journals.lww.com/00007691-199406000-00011>
 59. Tan A, Hussain S, Musuku A, Massé R. Internal standard response variations during incurred sample analysis by LC-MS/MS: Case by case troubleshooting. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(27):3201–9.
 60. Lloyd AS, Joseph JK, Joseph LG. *Practical HPLC Method Development.* 2nd ed. Canada: John Wiley & Sons, Inc; 1997.
 61. Imre S, Tero-Vescan A, Dogaru MT, Kelemen L, Muntean DL, Curticăpean A, et al. With or Without Internal Standard in HPLC Bioanalysis. A Case Study. *J Chromatogr Sci.* 2019;57(3):243–8.
 62. Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.* Silver Spring; 2018.
 63. Food and Drug Administration. *ICH Harmonised Guideline Bioanalytical Method Validation.* 2019.
 64. European Medicines Agency. *Guideline on Bioanalytical Method Validation.* 2011.
 65. Simons SA, Molinelli AR, Sobhani K, Rainey PM, Hoofnagle AN. Two cases with unusual vancomycin measurements. *Clin Chem.* 2009;55(3):578–80.
 66. Gunther M, Saxinger L, Gray M, LeGatt D. Two suspected cases of immunoglobulin-mediated interference causing falsely low vancomycin concentrations with the Beckman PETINIA method. *Ann Pharmacother.* 2013;47(4):2–5.
 67. Legatt DF, Blakney GB, Higgins TN, Schnabl KL, Shalapay CE, Dias VC, et al. The effect of paraproteins and rheumatoid factor on four commercial immunoassays for vancomycin: Implications for laboratorians and other health care professionals. *Ther Drug Monit.* 2012;34(3):306–11.
 68. Singer B, Stevens RW, Westley BP, Nicolau DP. Falsely elevated vancomycin-concentration values from enzyme immunoassay leading to

- treatment failure. *Am J Heal Pharm.* 2019;77(1):9–13.
69. Tsoi V, Bhayana V, Bombassaro AM, Tirona RG, Kittanakom S. Falsely Elevated Vancomycin Concentrations in a Patient Not Receiving Vancomycin. *Pharmacotherapy.* 2019;39(7):778–82.
 70. Setiabudy R. Therapeutic drug monitoring: focus on conditions in Indonesia. *Acta Med Indones.* 2011;43(3):208–11.
 71. Vila MMDC, De Oliveira RM, Gonçalves MM, Tubino M. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals. *Quim Nova.* 2007;30(2):395–9.
 72. Creative Diagnostics. Enzyme Immunoassay Kit for Vancomycin.
 73. BioVision Incorporated. Vancomycin ELISA Kit.
 74. Beckman Coulter. Emit 2000 Vancomycin Assay.
 75. Thermo Scientific. QMS® Vancomycin (VANCO).
 76. Gundersen Health System. Standard Operating Procedure Vancomycin – Integra 400. 2019;
 77. Sekisui Medical Co. L. Vancomycin Assay Kit Nanopia TDM Vancomycin. 2017;

