

**KAJIAN PERBANDINGAN METODE IMUNOASAI DAN
KCKT DALAM ANALISIS KARBAMAZEPIN DAN
METABOLIT KARBAMAZEPIN 10,11 – EPOKSIDA UNTUK
PEMANTAUAN KADAR OBAT DALAM DARAH**

SKRIPSI



Oleh:

ARVIDI NOVTIANI FEBIONA

16613005

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

**KAJIAN PERBANDINGAN METODE IMUNOASAI DAN
KCKT DALAM ANALISIS KARBAMAZEPIN DAN
METABOLIT KARBAMAZEPIN 10,11 – EPOKSIDA UNTUK
PEMANTAUAN KADAR OBAT DALAM DARAH**

SKRIPSI

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

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh:

ARVIDI NOVTIANI FEBIONA

16613005

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

SKRIPSI

KAJIAN PERBANDINGAN METODE IMUNOASAI DAN KCKT DALAM ANALISIS KARBAMAZEPIN DAN METABOLIT KARBAMAZEPIN 10,11 – EPOKSIDA UNTUK PEMANTAUAN KADAR OBAT DALAM DARAH

Yang diajukan oleh :

ARVIDI NOV TIANI FEBIONA
16613005

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Ari Wibowo, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping,



Dr. Vitarani D. A. Ningrum, M.Si., Apt

SKRIPSI

**KAJIAN PERBANDINGAN METODE IMUNOASAI DAN
KCKT DALAM ANALISIS KARBAMAZEPIN DAN
METABOLIT KARBAMAZEPIN 10,11 – EPOKSIDA UNTUK
PEMANTAUAN KADAR OBAT DALAM DARAH**

Oleh:

ARVIDI NOVTIANI FEBIONA

16613005

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: 23 OKTOBER 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, 23 Oktober 2020



Penulis,

(Arvidi Novtiani Febiona)



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 KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN 10,11 – EPOKSIDA DENGAN METODE <i>IMMUNOASSAY</i>	4
Analisis Karbamazepin Dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	8
Perbandingan Perolehan Hasil Antara <i>Immunoassay</i> Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Sebagai Metode Analisis Karbamazepin Dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida.....	20
Perbandingan Parameter Akurasi Dan Presisi Dari Kedua Metode	24
Perbandingan Parameter Selektivitas Dari Kedua Metode	24
Perbandingan Parameter Sensitivitas Dari Kedua Metode.....	25
Perbandingan Efisiensi Antara <i>Immunoassay</i> Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Sebagai Metode Analisis Karbamazepin Dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida.....	26
Perbandingan Waktu Yang Dibutuhkan Dari Kedua Metode	26
Perbandingan Biaya Yang Dikeluarkan Dari Kedua Metode	26
KESIMPULAN.....	27
DAFTAR PUSTAKA	27

KAJIAN PERBANDINGAN METODE IMUNOASAI DAN KCKT DALAM ANALISIS KARBAMAZEPIN DAN METABOLIT KARBAMAZEPIN 10,11 – EPOKSIDA UNTUK PEMANTAUAN KADAR OBAT DALAM DARAH

Arvidi Novtiani Febiona

Program Studi Farmasi

INTISARI

Karbamazepin (CBZ) merupakan salah satu obat anti epilepsi yang memiliki indeks terapeutik yang sempit dan mengakibatkan banyak interaksi obat, toksistas obat serta bersifat autoinduksi membentuk karbamazepin 10,11 – epoksida (CBZE) yang aktif. Metode bioanalisis untuk pemantauan kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida dalam darah diperlukan untuk meminimalkan toksisitas dan memaksimalkan efektivitas pengobatan. Pemantauan Kadar Obat dalam Darah (PKOD) biasanya dilakukan dengan dua metode yang umum digunakan dan mudah ditemukan yaitu teknik *immunoassay* dan kromatografi berdasarkan panduan yang ada. Tujuan kajian ini ditulis untuk memberikan gambaran umum hasil rangkuman berbagai jurnal ilmiah yang telah dikembangkan dalam penentuan kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida pada sampel biologis manusia dengan menggunakan metode *immunoassay* dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Sehingga, dapat digunakan sebagai sumber atau bahan pertimbangan dalam penentuan dan pemilihan metode bioanalisis yang tepat, efektif dan efisien dalam aplikasi pemantauan konsentrasi obat dalam darah. Langkah dalam rangka menyusun *review* berikut dengan menggunakan teknik studi pustaka yang memberikan hasil 34 artikel dan 8 referensi penunjang dengan dilakukan pencarian data media online, seperti database science direct, google scholar dan PubMed menggunakan kata kunci *bioanalysis, carbamazepine, carbamazepine 10,11 – epoxide, immunoassay* dan *HPLC*. Hasil yang didapatkan dari kajian ini sesuai dengan panduan yang ada dan dapat dijadikan rekomendasi pertimbangan terhadap PKOD karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida dengan kelebihan dan kekurangan masing-masing. Jika memerlukan prosedur analisis dengan waktu yang cepat dan pengerjaan sederhana dapat menggunakan metode *immunoassay*, Namun apabila ingin mendapatkan perolehan yang baik untuk selektivitas dan sensitivitas dapat menggunakan metode KCKT.

kata kunci: bioanalisis, karbamazepin, karbamazepin 10,11 – eposida, immunoassay, KCKT

**COMPARATIVE STUDY OF IMMUNOASSAY AND HPLC
METHODS IN THE ANALYSIS OF CARBAMAZEPINE AND
CARBAMAZEPINE METABOLITES 10,11 - EPOXIDES FOR
THERAPEUTIC DRUG MONITORING**

Arvidi Novtiani Febiona

DEPARTMENT OF PHARMACY

ABSTRACT

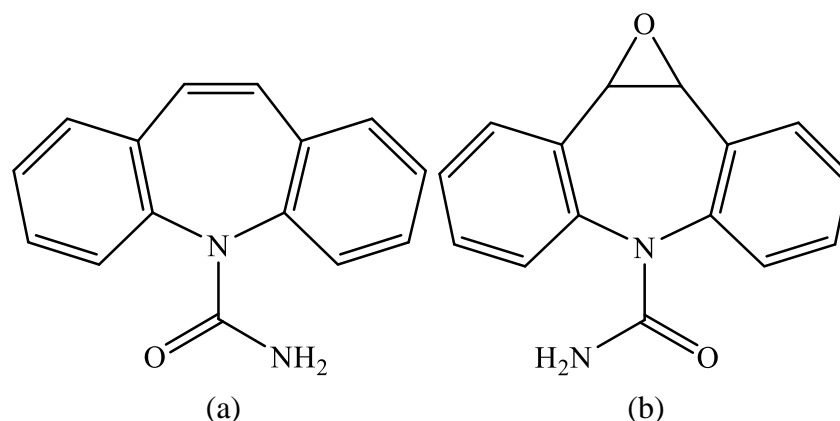
Carbamazepine (CBZ) is an anti-epileptic drug that has a narrow therapeutic index and causes many drug interactions, drug toxicity and is autoinduction to form active carbamazepine 10,11 - epoxide (CBZE). Bioanalytical methods for monitoring levels of carbamazepine and carbamazepine 10,11 - epoxide in the blood are needed to minimize toxicity and maximize the effectiveness of treatment. Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is usually carried out by two commonly used and easy to find methods, namely immunoassay and chromatography techniques based on existing guidelines. The purpose of this study is written to provide an overview of the summary results of various scientific journals that have been developed in determining the levels of carbamazepine and carbamazepine 10,11 - epoxide in human biological samples using immunoassay and High-Performance Liquid Chromatography methods. Thus, it can be used as a source or material for consideration in the determination and selection of appropriate, effective and efficient bioanalytic methods in therapeutic drug monitoring. The steps in order to compile the following review are using literature study techniques that provide 34 articles and 8 supporting references by searching online media data, such as database science direct, google scholar and PubMed using the keywords bioanalysis, carbamazepine, carbamazepine 10,11 - epoxide, immunoassay and HPLC. The results obtained from this study are in accordance with existing guidelines and can be used as recommendations for consideration of TDM carbamazepine and carbamazepine 10,11 - epoxide with their respective advantages and disadvantages. If you need an analysis procedure with a fast time and simple operation you can use the immunoassay method. However, if you want to get good results for selectivity and sensitivity you can use the HPLC method.

Keyword: *bioanalysis, carbamazepine, carbamazepine 10,11 – epoxide, immunoassay, HPLC.*

PENDAHULUAN

Epilepsi merupakan penyakit kronis yang terjadi pada syaraf pusat, biasanya mengakibatkan kejang berulang yang tidak di agitasi dan tidak dapat diperkirakan terjadinya sehingga mempengaruhi berbagai fungsi mental dan fisik. Epilepsi merupakan penyakit syaraf yang paling umum menyerang lebih dari 3 juta orang di AS dan sekitar 50 juta orang di seluruh dunia (1). Menurut tulisan Tedyanto, et al tahun 2020 yang mensitasi dari junal Muttaqin, 2012, Estimasi penderita epilepsi di Indonesia adalah 1,5 juta dengan prevalensi 0,5-0,6% dari penduduk Indonesia (2). Menurut fakta 70% penderita epilepsi menggunakan obat antiepilepsi (OAE) untuk menanganinya (3). Obat anti epilepsi (OAE) yang menjadi pilihan utama yaitu karbamazepin (CBZ) (4).

Karbamazepin bekerja dengan menghambat kanal natrium untuk mempertahankan aksi potensial secara berulang pada neuron. Karbamazepin juga dapat menghambat eksitasi neurotransmitter dengan menghambat kanal natrium pre-sinaps dan menurunkan transmisi sinaptik neurotransmitter (5). Selain itu, karbamazepin (CBZ) memiliki berbagai profil farmakokinetik seperti variabilitas antar individu, kemungkinan interaksi obat-obat yang tinggi dan indeks terapeutik yang sempit berkisar 4–12 mg / L sehingga sulit untuk menentukan dosis yang sesuai (6).



Gambar (a) Struktur karbamazepin dan **(b)** karbamazepin 10,11-epoksida

Karbamazepin juga menginduksi enzim pemetabolime yang mengakibatkan banyak interaksi dan toksistas obat serta bersifat autoinduksi membentuk karbamazepin 10,11 – epoksida (CBZE) yang bersifat aktif (7). Mekanisme kerja karbamazepin epoksida masih belum diketahui secara pasti tetapi dimungkinkan memiliki efek terapi yang hampir sama dengan karbamazepin (5). Adapun beberapa hal buruk yang dapat ditimbulkan dari penggunaan karbamazepin jangka panjang yang dapat terjadi seperti, kurangnya penglihatan, sistem kekebalan menurun, efek hematologi, serta gangguan ginjal dan hati (8).

Interaksi dan toksisitas obat tersebut dapat diminimalkan dengan pemantauan konsentrasi obat dalam darah (PKOD). Pemantauan konsentrasi obat juga dilakukan untuk mempertahankan kadar obat agar tetap dalam rentang terapi dan dapat menguntungkan dalam penentuan dosis terapi (3). Pemantauan konsentrasi obat dalam darah (PKOD) perlu dilakukan untuk memberikan pengobatan yang optimal bagi pasien (6). Pemantauan kadar karbamazepin (CBZ) dan karbamazepin 10,11 – epoksida (CBZE) pada sampel biologis manusia biasanya dilakukan dengan dua metode yang paling sering digunakan yaitu teknik *immunoassay* (14-23) dan kromatografi (17,21,29,31-33,37-49). Dua metode tersebut merupakan metode terbanyak yang dikembangkan dengan kelebihan dan kekurangannya masing-masing. *Immunoassay* memiliki waktu analisis yang lebih cepat di bandingkan KCKT. Namun, metode KCKT memberikan hasil sensitivitasnya dan selektivitasnya lebih unggul dalam menganalisis beberapa sampel (9).

Kajian ini ditulis untuk memberikan gambaran umum hasil rangkuman berbagai jurnal ilmiah yang telah dikembangkan dalam penentuan kadar karbamazepin (CBZ) dan karbamazepin 10,11 – epoksida (CBZE) pada sampel biologis manusia sebelumnya dengan menggunakan metode *immunoassay* dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), serta membandingkan antara kedua metode untuk penentuan karbamazepin (CBZ) dan karbamazepin 10,11 – epoksida (CBZE) pada sampel biologis manusia. Perbedaan kajian ini dengan sebelumnya yaitu membandingkan kedua metode dengan berbagai faktor yang sesuai panduan analisis. Namun, fokus utama dan tujuan dilakukannya kajian ini yaitu dapat

digunakan sebagai sumber atau bahan pertimbangan dalam penentuan dan pemilihan metode bioanalisis yang tepat, efektif dan efisien untuk pemantauan konsentrasi obat dalam darah (PKOD) karbamazepin (CBZ) dan karbamazepin 10,11 – epoksida (CBZE) pada sampel biologis manusia.

METODE

Langkah dalam rangka menyusun *review* berikut dengan menggunakan teknik studi pustaka mencari sumber literatur bentuk primer yang berupa jurnal nasional maupun internasional. Selain itu, dalam pembuatan review ini juga dilakukan pencarian data dengan media online, seperti database science direct, google scholar dan PubMed menggunakan kata kunci *bioanalysis, carbamazepine, carbamazepine 10,11 – epoxide, immunoassay* dan *HPLC*. Kriteria inklusi dari jurnal ilmiah yang ditentukan yaitu, terpublikasi dalam Bahasa Inggris atau Bahasa Indonesia, merupakan artikel hasil penelitian, memiliki topik penelitian bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida menggunakan *immunoassay* atau KCKT dan perbandingan keduanya 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 tidak membahas terkait farmakokinetik karbamazepin dan metabolit nya 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. Selain itu digunakan juga referensi penunjang sebanyak 8 referensi.

Analisis Karbamazepin Dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida Dengan Metode *Immunoassay*

Immunoassay merupakan komponen penting dalam laboratorium klinis modern. Berbagai macam analit, hormon, protein serum, antibodi yang terhadap infeksi atau alergen, pemantauan kadar obat (PKOD), dan penyalahgunaan obat-obatan dapat diukur menggunakan *immunoassay* (10). Metode *immunoassay* didasarkan pada hubungan antigen dengan antibodi sebagai reagent melalui ikatan spesifik dan non spesifik (11). Ikatan dari antibodi membuat *immunoassay* berguna untuk deteksi dan menentukan hasil kualitatif atau kuantitatif dari analit sampel (12) Penggunaan *immunoassay* memberikan hasil yang cepat, keterulangan yang baik, relatif murah, sensitivitas dan spesifisitas tinggi, dan memiliki waktu analisis singkat dengan prosedur yang sederhana karena tidak melakukan preparasi sampel (13)(11).

Berbagai teknik metode *immunoassay*, seperti *particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay* (PETINIA) (18-21,23), *enzyme mediated immunoassay* (EMIT) (15-18,21), *cloned enzyme donor immunoassay* (CEDIA) (19), *ADVIA Centaur* (18-20), *chemiluminescent immunoassay* (CLIA) (17,22), dan *fluorescence polarization immunoassay* (FPIA) (14,15,22) untuk penentuan kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida dalam cairan biologis manusia telah banyak dikembangkan dan diteliti. Penelitian-penelitian terdahulu mengenai pengukuran kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida menggunakan *immunoassay* telah terangkum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Metode *Immunoassay* untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 - Epoksida

Analit	Matriks	Metode	Sensitivitas (mg/L)	%Recovery	Rentang Konsentrasi (mg/L)	CV (%)	<i>cross-reactivity</i>	Ref
CBZ	Serum	FPIA	0,5	-	1,4 – 20,9	-	-	(14)
CBZ	Serum	EMIT 2000 HITACHI 704	-	99,90%	0 - 18	3,3 – 7,1 %	-	(15)
		EMIT 2000 COBAS MIRA	-	94,80%	0 - 18	3,25 – 5,54 %	-	
		FPIA TDx	-	94,90%	0 - 18	-	-	
CBZ	Plasma	EMIT	-	-	2.1 - 50	2.7 %	-	(16)
CBZ CBZE	Plasma	CLIA	-	-	0.5 - 25	5,21 – 6,46%	-	(17)
			-	-	0.1 - 10	-	-	
CBZ & CBZE	Plasma	EMIT	-	-	0,5 - 21,7	-	-	(18)
		PETINIA	-	-	0,5 - 21,7	-	94%	
		ADVIA Analyzer	0,5	92,6 - 105,6%	0,5 - 21,7	-	-	
CBZ & CBZE	Serum	PETINIA	-	-	0,5 - 20	-	96,20%	(19)
		ADVIA Analyzer	-	-	0,25 - 18	-	6,50%	
		CEDIA	-	-	0,5 - 20	-	10,50%	
CBZ & CBZE	Plasma	PETINIA	-	-	0,25 - 18	-	95,70%	(20)
		ADVIA Analyzer	-	-	0,5 - 20	-	6,30%	

Tabel 1. Lanjutan Metode *Immunoassay* untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 - Epoksida

Analit	Matriks	Metode	Sensitivitas (mg/L)	%Recovery	Rentang Konsentrasi (mg/L)	CV (%)	<i>cross-reactivity</i>	Ref
CBZ & CBZE	Plasma	PETINIA	-	-	0,5 - 20	-	90 - 92 %	(21)
		EMIT	-	-	0,5 - 20	-	-	
CBZ & CBZE	Serum	FPIA	-	-	0 - 20	-	-	(22)
		CLIA	-	-	0 - 20	-	-	
CBZ		<i>The new turbidimetric immunoassay</i>	-	102,20%	0 - 20	3,5-4,9 %	-	
CBZ & CBZE	Serum	PETINIA	-	-	0 - 18	-	-	(23)

Keterangan a) CBZ : Karbamazepin
b) CBZE : Karbamazepin 10,11 epoksida

Metabolit karbamazepin yang aktif yaitu karbamazepin 10,11 - epoksida tidak dapat diukur dengan metode *immunoassay* karena nilai reaktivitas silang yang mampu memberikan hasil *positive* palsu dalam analisis kuantitatif dengan menggunakan *immunoassay* (19)(20). Namun, menurut penelitian yang dilakukan Hermida et al tahun 2002 karena karbamazepin 10,11 - epoksida bekerja dengan cara yang mirip dengan senyawa induk, maka pengukuran konsentrasi karbamazepin dan karbamazepin – 10,11 epoksida sebaiknya dikorelasikan dengan observasi efek terapeutik dan toksisitas pada pengukuran karbamazepin itu sendiri.

Mengutip tanggapan penelitian Shen et al 2001, menyatakan bahwa sistem analisis yang paling mutakhir tidak dapat mengukur secara kuantitatif karbamazepin 10,11 - epoksida, dengan pengecualian penting untuk *immunoassay Dimensi Dade* yang mengukur karbamazepin dan karbamazepin 10,11 - epoksida, dengan perkiraan reaktivitas silang karbamazepin 10,11 - epoksida 93,6% (24). Namun dalam penelitian lanjutan yang dilakukan hermidia et al tahun 2003 mendapatkan hasil yang tidak sesuai dengan apa yang dirangkum dalam penelitian sebelumnya dan pada penelitian shen et al tahun 2001 (23,25). Di sisi lain, metode EMIT menunjukkan tidak ada reaktivitas silang dengan karbamazepin 10,11 - epoksida karena spesifisitas yang sangat tinggi dari antibodi monoclonal sehingga dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi karbamazepin saja (21).

Tabel 2. Perbandingan Antar Metode *Immunoassay*

Analit	Matriks	Metode	Jumlah Sampel	r	rata-rata perbedaan	Persamaan	Ref
CBZ	Serum	EMIT vs FPIA TDx	147	0,99	-	$y = 1,03 x - 1,087$ EMIT (y) = 1,03 FPIA TDx (x) = 1,087	(15)
CBZ	Plasma	EMIT vs ADVIA	75	0,99	-	$y = 1,04 x + 0,32$ ADVIA (y) = 1,04 EMIT (x) = 0,32	(18)

Tabel 2. Perbandingan Antar Metode *Immunoassay*

Analit	Matriks	Metode	Jumlah Sampel	r	rata-rata perbedaan	Persamaan	Ref
CBZ CBZE CBZ	Plasma	PETINIA vs ADVIA PETINIA vs CEDIA	15	0,99 0,9 0,98	-	y = 0,9848 x - 0,0312 y = 1,0863 x - 0,1626 y = 0,9989 x - 0,0579	(19)
CBZE CBZ & CBZE	Plasma	PETINIA vs EMIT	49	0,75 - -	6 - 8 %	y = 0,9989 x - 0,0579 - -	(21)
CBZ & CBZE	Plasma	FPIA vs CLIA	54	0,98	15%	y = 0,85 x + 0,04 x = FPIA 0,04 y = CLIA 0,85	
CBZ & CBZE		CLIA vs NTI		0,99	10%	y = 1,10 x - 0,32 x = CLIA 0,32 y = NT 1,10	(22)
CBZ		FPIA vs NTI		0,99	-	y = 0,96 x - 0,46 x = FPIA 0,46 y = NT 0,96	

Keterangan a) CBZ : Karbamazepin
b) CBZE : Karbamazepin 10,11 epoksida

Berbagai perbandingan antar metode *immunoassay* pada studi terdahulu dirangkum dalam table 2 dengan menggunakan parameter koefisien korelasi (r) yang menunjukkan kekuatan dan seberapa baik kedekatan hasil dari beberapa variable. Perbandingan hasil antar metode *immunoassay* menunjukkan rentang nilai 0.95 – 0.99, rentang nilai tersebut di dalam pedoman termasuk ke dalam kategori korelasi hampir sempurna (26). Namun, karena adanya reaktivitas silang yang disebabkan oleh karbamazepin 10,11 – epoksida maka hasil yang didapatkan memungkinkan memberikan hasil yang bias, maka dari itu perlu penyesuaian metode yang dibandingkan dengan melihat nilai reaktivitas silang metode tersebut (15,22).

Analisis Karbamazepin Dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Penetapan kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 epoksida pada sampel biologis manusia dilakukan dengan metode teknik kromatografi. Teknik tersebut dinilai lebih *sensitive*, spesifik, dan dapat mendeteksi konsentrasi terkecil dari analit dengan akurasi dan presisi yang baik (27). Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah metode kromatografi yang umum digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi dan mengukur komponen campuran. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat digunakan dalam berbagai bidang biokimia, ilmu klinis, forensik, ilmu lingkungan, *nutraceuticals* dan obat-obatan. Pada bidang penelitian secara klinis, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat digunakan untuk analisis percobaan obat atau kuantifikasi komponen biologis dalam sampel pasien (28). Penetapan kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 epoksida banyak diteliti menggunakan metode KCKT dalam berbagai sampel biologis terangkum dalam table 3.

KCKT untuk menganalisis suatu obat, sebagian besar menggunakan teknik pemisahan partisi-*reversed phase* (fase terbalik). Prinsip pemisahan dengan teknik fase terbalik yaitu berdasarkan tingkat kepolaran antara analit atau *solute* dengan fase gerak. Fase gerak yang sering digunakan dalam teknik fase terbalik yaitu campuran air dan asetonitril, metanol atau dengan campuran larutan *buffer* (29). Sedangkan fase diam yang sering digunakan dalam pemisahan karbamazepin dan karbamazepin 10,11 epoksida berdasarkan table 3 yaitu jenis kolom C18 dengan rentang ukuran partikel sekitar 1,7-10 5 μm (16,17,31,37-47,49) dan jenis kolom C8 dengan ukuran partikel 4,6-5 μm (20,31,32,47). *Octadecyl silika* (ODS atau C₁₈) merupakan fase diam yang sering digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi (35). Pemisahan di dalam kolom dipengaruhi oleh adanya ikatan *van der wals* dari senyawa non polar yang akan membentuk daya tarik dengan gugus hidrokarbon sehingga menghasilkan waktu retensi yang singkat (36).

Pada saat akan melakukan penetapan kadar suatu obat dengan metode kromatografi perlu dilakukan preparasi sampel sebelum dilakukan analisis. Maksud dari dilakukannya preparasi sampel adalah untuk meminimalkan adanya pengotor yang akan mengganggu proses analisis dengan menghilangkan senyawa selain analit. Pemisahan pengganggu dalam sampel dapat meningkatkan *sensitivitas*, spesifisitas, akurasi dan presisi, serta mampu memperpanjang masa penggunaan kolom KCKT. Preparasi sampel dalam analisis kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida dengan metode kromatografi seperti pada table 3 dilakukan menggunakan metode pengendapan protein (17,21,31,37,40-43,47-49), ekstraksi cair – cair (39,41,46), *Solid Phase Extraction* (SPE) (16,32,33,38,45,48) dan *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE) (44). Waktu yang digunakan untuk preparasi sampel juga bervariasi mulai dari 10 – 60 menit tergantung menggunakan metode preparasi yang digunakan.



Tabel 3. Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ CBZE PHT	Plasma manusia 500 µL	PP	10	10,11 dihydr ocarbamazepine	Aseton otril : metano l :Na fosfat pH 6,9; 0,05 M (18:18: 64 v:v:v)	Spherisorb ODS2 (150 x 4,6 mm, 3 µm)C18	UV 210 nm	0,85	20	CBZ (11,8) CBZ- E (5,8)	CBZ (0,05 - 25,0).	lebih dari 79%	-	-	CBZ (0,05)	-	6,2 – 7,7 %	(37)
CBZ, OXC, EXCB Z & metabo lites	Plasma manusia 500 µL	SPE dg filtra si	10	10,11- dihydr ocarb amazep ine	Air : Metano l:Aseto nitril (64:30: 6, v/v/v),	LiChroCAR T® Purospher® Star C18 (55 mm×4 m, 3 µm)	UV 235 nm	1	15	CBZ E (2,8) CBZ (6,98)	CBZ- E (0,10- 30,0) CBZ CBZ (0,05- 30,0)	CBZ (79,99% - 91,87%) CBZE (85,72% - 91,52%)	CBZ (0,05) CBZ E (0,1)	CBZ (0,05) CBZ E (0,1)	-	-	CBZ (2,67- 5,32 %) CBZ E (2,31- 6,61%)	(38)
CBZ & PHT	serum manusia 100 µL	ECC	10	Pheno barbit al	Metano l : Air : Asam asetat glasial (67:33: 1, v/v/v)	<i>reverse</i> <i>phase</i> C18 adsorbosphe re×Wakosil II, SGE, Japan Inc (250 x 4,6 mm, 5 µm)	UV 230 nm	1	15	CBZ (6,2)	CBZ (0,05 - 100)	CBZ (100,16- 107,4%)	-	CBZ (0,05)	-	CBZ (99, 1 – 103 ,12 %)	CBZ (0,79 –) 4,52%	(39)

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ & CBZE	Plasma manusia 500 µL	PP	30	10,11-dihydrocarbamazepine	Asetonitril : metanol : air (18:19:63, v/v/v)	CAPCELL PAK C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	UV 210 nm	1,2	-	CBZ-E (9,8) CBZ (20,0)	CBZ (0,01-10) CBZE (0,005-5)	CBZ (92,4-107 %) CBZ E (83 % - 87,4%)	CBZ (< 2) CBZ E (< 3)	CBZ (0,01) CBZ E (0,005)	-	CBZ (92,6-102,4 %) CBZE (93,8-104,2 %)	CBZ (0,6-5,6 %) CBZE (3,2-16,6 %)	(40)
CBZ CBZE PRM LTG PB Lic OXC PHT transdiol	plasma manusia 500 µL	SPE dan pengendapan	15	ketoprofen	Air : metanol : asetonitril : Trietilamin (68,7:25:6:0,3, v/v/v/v) ph 6,5	LiChroCAR T Purospher Star C18 column (55 mm×4 mm, 3 µm)	UV 237 nm	1	-	CBZ E (5,8) dan CBZ (15,0)	CBZ dan CBZ E (0,1-50)	CBZ (86,7-88,89%) CBZ E (85,27-90,46%)	-	CBZ (0,1) dan CBZ E (0,1)	-	-	CBZ (3,13-10,57 %) CBZE (4,08-8,55 %)	(29)

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ & CBZE	plasma dan air susu manusia @1000 µL	SPE	-	2 Metil CBZ	0,5% potasium dihidrogen fosfat (pH2,5) : Asetonitril (67:33, v/v).	Develosil C8, (150x 4,6mm)	UV 254 nm	1	15	CBZ E (+- 5) CBZ E (+- 9) (ASI dan plasma)	CBZ (0,01-6) CBZE (0,02-6)	CBZ (91,1-98% ,ASI) CBZ (90,6-97,1% , plasma) CBZ E (88,9-99,5% , ASI) (92,1-104% , plasma)	CBZ (0,05) CBZ E (0,05) ASI (0,05) Plasma (0,05)	CBZ (0,01) CBZ E (0,02)	-	-	CBZ (1,6 – 5,8% ,ASI) (2,3-8,3% , plasma) CBZ E (2,8-10,5% , ASI) (5 – 9,6% , plasma)	(32)
CBZ LTG PRM PHT	serum manusia 50 µL	ECC	-	tidak disebutkan	Air: Asetonitril: metanol: trietilamin (72:23:5: 0,1, v/v/v) pH 7.0	SGX C18 (3x150 mm, 5 µm)	UV 220 nm	1	20	CBZ (14,7 89)	CBZ (0,625 -12,5)	CBZ (80,7%) CBZE (66,3%)	CBZ (0,13 2) CBZ E (0,10 6)	CBZ (1,25) CBZ E (0,62 5)	-	-	CBZ (2,2-8,2%) CBZ E (2,2 – 9,6 %)	(41)

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ	plasma manusia 250 µL	PP	9	Klorpromazin	bufer fosfat (0,1% Trietilamin, pH 3,0) : Asetonitril : metanol (60:30:10, v/v/v).	C18 analytical column (150 mm x 3,9 mm, 5 µm)	UV 220 nm	1	20	CBZ (2,6)	CBZ (0,5-40)	CBZ (82,4 – 105,7%)	CBZ (0,04)	CBZ (0,122)	-	CBZ (5,6 – 3,6%)	CBZ (1,3 – 4,2%)	(31)
CBZ CBZE & metab	plasma manusia 250 µL	SPE	20	Amoxapin	Asetonitril/metanol/bufer fosfat 15 M pH 1,9 mengandung TEA (17,5:20:62,5, v/v/v)	Microsorb MV Rainin (C8, 150 x 4,6 mm, 5 µm)	UV 237 nm	1,2	20	CBZ (16,5) CBZE (8,9)	CBZ (0,5–15,0) CBZE (0,012-5-15)	CBZ (96,7%) CBZE (90,8%)	CBZ (0,02) CBZE (0,04)	CBZ (0,06) CBZE (0,012)	-	CBZ (94 – 99,8%) CBZE (10,2-103%)	CBZ (0,83-1,29%) CBZE (0,53-1,98%)	(33)

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ CBZE OXC PHT PBB 10OHC BZ	Serum manusia 500 µL	PP	10	Oxazepam	Bufet Na Asetat (7 M, pH 7) : Asetonitril (78:22, v/v)	C18 Ultrabiosep (150x4,6 mm, 5 µm)	UV 240 nm	2	30	CBZ (2,6)	CBZ (0,5-40)	CBZ (96,52%) CBZE (94,45%)	-	CBZ (0,66) CBZE (2,35)	-	-	CBZ (1,53) - 8,61% CBZ (42) E (0,43-38,41%)	
CBZ CBZE ZNS	Serum infant 100 µL	PP	15	Klorzoxazon	Buffer Potassium Phosphate (pH 4,6 ; 2,5mM) : metanol : acetonitril (60:20:15, v/v/v)	Cadenza CD-C18 kolom (4,6mmx150 mm, 3 µm)	UV 215 nm	1	18	CBZ (6,2)	CBZ (0,05 - 100)	CBZ (100,7-102,4%) CBZE (100,0-102,9%)	-	CBZ (0,5) CBZE (0,25)	-	-	CBZ (96,3-105,1%) CBZ (2,76-4,84%) CBZE (2,99-5,73%) (43)	

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ CBZE PHT PHB	plasma manusia 1000 µL	SBS E	SBS E 60 menit ECC 7 menit	5-ethyl-5-p tolylb arbitur ic acid	Air : Asetoni tril (78:22 , v/v)	LiChrospher 100 RP-18 column (125mm×4mm, 5µm)	UV 220 nm	1	40	CBZ E (10,1) CBZ(32,5)	CBZ (0,08-40) CBZE (0,08-40)	CBZ (86,7%) CBZE (80,3%)	-	CBZ (0,08) CBZ E (0,08)	-	CBZ (3,7 – 9,2 %) CBZE (8,6 – 9,2 %)	CBZ (3,7 – 8,8%) CBZE (6,4 – 8,5%)	(44)
CBZ OXC PTN PRM	plasma manusia dan urin manusia 1000 µL	SPE canggih MEP S	35	-	Air : Asetoni tril : metano l (55:30:15, v/v/v)	Dionex Acclaim 120 C18 column (250mm x 4,6 mm, 5 µm)	UV 215 nm	1,2	12	CBZ Plasma (8,94) CBZ Urin (8,94)	CBZ (0,001 – 0,5)	CBZ Plasma (89,62-98,68%) CBZ urin (93,39-98,36%)	CBZ (0,0004)	CBZ (0,00036)	-	-	CBZ Plasma (2,7 – 4,2%) CBZ urin (2,9 – 4,3%)	(45)

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ & CBZE	plasma manusia 600µL	ECC	20	Lorazepam	0,1M sodium fosfat: metanol (49:51, v/v)	stainless-steel column C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm)	UV 225 nm	1	12	CBZ (7,0) CBZE (3,3)	CBZ dan CBZE (0,10 to 10,0)	CBZ Plasma (89,8%) CBZE (86,8%)	-	CBZ dan CBZE (0,10)	-	CBZ (2,4 – 11,6%) CBZE (5,2 – 6,8%)	CBZ (5,5 – 6,4%) CBZE (5,5%)	(46)
CBZ CBZE LTG PHT	Serum manusia 200µL	PP dan Fitriani	25	Fenobarbitone	Bufor fosfat (10 mM): metanol:ACN: Aseton (55:22:12:11, v/v/v/v) pH 7,0	NOVA PAK C-18 column (250mm x 4,6 mm, 5 µm)	UV 210 nm	1,2	15	CBZ (8,85) CBZE (5,08)	0	CBZ (95,99 - 103,33%)	CBZ dan CBZE (0,1)	CBZ dan CBZE (0,2)	-	CBZ (99,11 – 104,07%) CBZE (2,78-6,221%)	CBZ (2,78-6,221%)	(47)

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref
CBZ CBZ E LTG OXC	plasma manusia 500 µL	SPE	-	-	Air : Asetoni tril: Metano l : Asam asetat : Trietila min (725:15 0:125:1 :0,6 , v/v/v/v/ v)	Zorbax SB- CN (250mm × 4,6mm, 5 µm)	UV 214 nm	1,2	15	CBZ (10) CBZ E (6,8)	CBZ (0,3– 60) CBZE (0,3– 50)	CBZ (95.8 - 102.84 %) CBZE (97.54 - 101.87 %)	-	CBZ dan CBZ E (0,2)	-	CBZ Z (99 - 105 %) CB Z E (99 - 102 %)	-	(48)
CBZ, CBZE, PRM, PTB, PHB, and PHT	Serum heparin 100 µL	PP	20	5- ethyl- 5- ptolyl barbit uric acid	phosph ate buffer, pH 6.5:met hanol: acetonit rile (77:20: 3)	RP-18E monolithic column (3 x 100 mm, 3 mm; 15 µm Merck, Darmstadt, Germany)	UV 210 nm	2,1	15	CBZ (15) CBZ E (4,9)	CBZ (4.1– 42.3) CBZE (0.5– 21.2)	CBZ (82.6– 105.5%) CBZE (100,0– 114,0%)	-	-	CBZ (4,1) CBZ E (0,05)	-	CBZ (1,5– 3,1%) CBZE (0,0– 5,3%)	(49)

Tabel 3. Lanjutan Metode KCKT untuk Analisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Analit	Matriks	PS	WP (mnt)	SI	Fase gerak	kolom	D	Kec. A (mL/mnt)	tA (mnt)	Tr (mnt)	Linearitas (mg/L)	%Rec	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	LLoQ (mg/L)	Acc (%)	CV (%)	Ref	
CBZ & CBZE	Serum manusia 200 µL	PP	10	-	0.05 mol/L phosphate buffer-asetonit ril (33:77 v/v)	reversed-phase C8 4µ, 3.9 ID × 150 mm column (Waters)	DA D 226 dan 240 nm	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(21)
CBZ & CBZE	Serum manusia 100 µL	PP	10	-	asetonit ril:metanol:air (18:19:63, v/v/v)	reverse-phase 18 column (250 mmx4 mm, 5 mm LiChrospher 100 RP-18)	UV 210 nm	1,2	25	CBZ (19.2) CBZ E (8.53)	CBZ (0.5–25) CBZE (0.1–10.0)	CBZ (98.21–105.3%) CBZE (96.23–100.05%)	CBZ (0,17) CBZ E (0,06)	CBZ (0,42) CBZ E (0,08)	-	CBZ (109,49%) CBZ E (10,674%)	CBZ (2,98%) CBZE (3,06%)	(17)	

Keterangan	a) CBZ	: Karbamazepin
	b) CBZE	: Karbamazepin 10,11 epoksida
	c) PHT	: Fenitoin
	d) PB	: Fenobarbital
	e) PRM	: Primidon
	f) LTG	: Lamotrigin
	g) 10-OH-CBZ	: 10 hidrokarbamazepin
	h) OXC	: Oxcarbazepin
	i) Lic	: Licarbazepin
	j) ZNS	: Zonisamid
	k) LEV	: Leviteracetam
	l) OAE	: Obat antiepilepsi
	m) PS	: Preparasi Sampel
	n) WP	: Waktu Preparasi
	o) SI	: Standar Internal
	p) D	: Detektor
	q) Kec. A	: Kecepatan Aliran
	r) tA	: Waktu Analisis
	s) Tr	: Waktu Retensi
	t) % Rec	: Persen <i>Recovery</i> / Perolehan Kembali
	u) LOD	: <i>Limit Of Detection</i>
	v) LOQ	: <i>Limit Of Quantification</i>
	w) LLOQ	: <i>Limit Low Of Quantification</i>



Perbandingan Perolehan Hasil Antara Immunoassay Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Sebagai Metode Analisis Karbamazepin Dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida

Dengan membandingkan kedua metode dalam mengukur konsentrasi CBZ dan CBZE dengan KCKT dan CBZ dengan *immunoassay* CLIA(17), CMIA(50) dan FPIA(24) atau mengukur konsentrasi CBZ dengan mengabaikan CBZE, memberikan nilai korelasi yang baik dan hasil pengukuran konsentrasi yang mirip. Namun, hasil dengan metode KCKT secara signifikan lebih baik daripada yang diperoleh dengan metode *immunoassay*. Hal tersebut terjadi karena reaktivitas silang dari metabolit CBZ dalam pengukuran dengan metode *immunoassay* (17,24,50). Pengujian immunoassay dibandingkan dengan HPLC yang dilakukan oleh chai et al 1994 dalam pengukuran CBZE dengan KCKT dibandingkan FPIA mengukur CBZ memberikan nilai korelasi yang buruk (51).

Pengukuran konsentrasi CBZ dengan membandingkan KCKT dan *immunoassay* jenis EMIT yang memiliki nilai reaktivitas silang rendah dalam mengukur metabolit CBZ, mendapatkan nilai korelasi yang sangat baik dan menghasilkan konsentrasi CBZ lebih besar dengan metode EMIT daripada menggunakan metode KCKT (16,52). Metode EMIT tidak disarankan untuk mengukur metabolit CBZ karena memberikan hasil konsentrasi yang buruk ataupun bias terbaca (52). Tabel 4 menyajikan perbandingan metode *Immunoassay* dengan metode KCKT. Persamaan dalam tabel 4 merupakan tambahan informasi untuk pembaca dalam memperkuat nilai koefisien korelasi untuk membandingkan konsentrasi kedua metode.

Tabel 4. Perbandingan Metode *Immunoassay* Dengan Metode KCKT.

Metode	Matriks	Jumlah Sampel	r	Rata-rata Perbedaan	Persamaan	Ref
HPLC vs PETINIA	Serum	66	0,993	-	HPLC = 1,09 (dd) + 0,07	(23)
HPLC vs FPIA			0,971	-	HPLC = 1,23 (cobas) + 0,25	
HPLC vs PETINIA	Serum	49	0,978	-	(CBZ PETINIA) = 1,05 (CBZ HPLC) + 0,77 (CBZ-E HPLC) + 0,97	(21)
HPLC vs EMIT			0,975	-	(CBZ EMIT) = 1,01 (CBZ HPLC) + 0,01 (CBZ-E HPLC) + 0,37	
CLIA CBZ vs HPLC CBZ + CBZE	Serum	75	0,9707	1,07 mg/mL	-	(17)
HPLC vs CLIA CBZ			0,9672	-0,073 mg/mL	-	
EMIT vs HPLC CBZ	Serum	96	0,979	-	HPLC CBZ = 0,945 (EMIT CBZ)-0,158	(53)
EMIT vs HPLC CBZ + CBZE			0,917	besar dari 15%	HPLC CBZ+CBZE = 1,187 (EMIT CBZ) +0,169	

Tabel 4. Lanjutan Perbandingan Metode *Immunoassay* Dengan Metode KCKT.

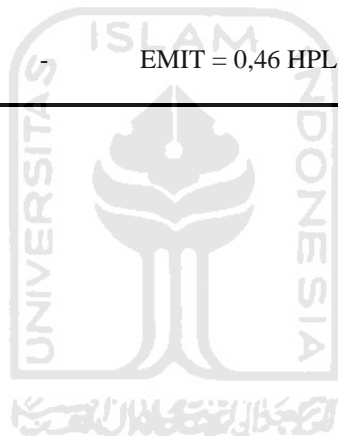
Metode	Matriks	Jumlah Sampel	r	Rata-rata Perbedaan	Persamaan	Ref
FPIA vs HPLC CBZ	serum	10	0,981	050 mg/L	$FPIA = 0,97 HPLC + 0,20$	(24)
HPLC CBZ+ CBZE vs FPIA CBZ		91	0,975	0,67 mg/L	$CBZ+CBZE = 1,23 CBZ - 0,05$	
CMIA vs HPLC CBZ	Serum	151	0,949	11%	$CMIA = 1,303 + 0,839 HPLC$	(50)
FPIA vs HPLC CBZ			0,93 (r2)	-	$FPIA = 1,13 HPLC CBZ + 0,09$	
FPIA CBZ vs HPLC CBZ + CBZE	serum	102	0,89 (r2)	-	$FPIA = 0,93 HPLC CBZ + CBZE - 0,55$	(51)
FPIA CBZ vs HPLC CBZE			0,22 (r2)	-	$FPIA = 1,13 HPLC CBZE + 4,75$	
EMIT vs HPLC CBZ	plasma	90	0,983	-	$EMIT = 0,936 HPLC - 0,93$	(52)

Tabel 4. Lanjutan Perbandingan Metode *Immunoassay* Dengan Metode KCKT.

Metode	Matriks	Jumlah Sampel	r	Rata-rata Perbedaan	Persamaan	Ref
EMIT vs HPLC FREE CBZ	plasma	140	0,921	-	EMIT = 1,17 HPLC + 0,89	(16)
EMIT vs HPLC TOTAL CBZ			0,885	14%	EMIT = 0,95 HPLC + 5,5	
EMIT vs HPLC total + free CBZE			0,34		EMIT = 0,46 HPLC + 0,68	

Keterangan

- a) CBZ : Karbamazepin
- b) CBZE : Karbamazepin 10,11 epoksida



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* (54,55). Pada tabel 4 yang merangkum analisis terdahulu menggunakan KCKT dapat menggambarkan nilai akurasi yang baik. Sedangkan, pada penelitian yang dilakukan Maria J et al tahun 2008 menggunakan metode EMIT dan KCKT mendapatkan nilai akurasi EMIT 15% lebih besar dari KCKT (53). Pada penelitian yang dilakukan Contin et al tahun 1985 mendapatkan nilai akurasi metode EMIT lebih besar 14% dibandingkan dengan KCKT (16). Peningkatan nilai akurasi CBZ yang tinggi dengan *immunoassay* jenis EMIT bisa terjadi akibat dari reaktivitas silang antibodi dengan struktur yang mirip dari metabolit CBZ. Dan penelitian yang dilakukan deng et al tahun 1986 pada kesimpulannya mendapatkan bahwa 10 mg/L dari metabolit epoksida menghasilkan 30% kesalahan kuantitasi (ditingkatkan dalam "kalibrator" yang mengandung 8 mg/L karbamazepin) (56). Namun, nilai akurasi dari metode EMIT masih dapat diterima dan dikatakan tidak jauh berbeda dengan metode KCKT.

Untuk perolehan presisi atau CV yang merupakan nilai pengukuran yang sama antara satu dengan yang lain, yaitu pada rentang $\pm 15\%$ atau $\pm 20\%$ (LLoQ) untuk KCKT dan $\pm 20\%$ atau $\pm 25\%$ (LLoQ) untuk *immunoassay* (54,55). Pada penelitian yang dilakukan elyas et al tahun 1982 mendapatkan nilai presisi EMIT lebih tinggi dibandingkan dengan metode KCKT (52). Pada penelitian yang juga dilakukan Paxton et al tahun 1982 mendapatkan nilai presisi EMIT 9.5% sedangkan KCKT 3.3% dan yang menyatakan presisi EMIT lebih baik dibandingkan KCKT dalam analisis karbamazepin (57).

Perbandingan Parameter Selektivitas Dari Kedua Metode

Selektivitas merupakan salah satu bagian penting dalam PKOD, metode yang digunakan harus mempunyai kemampuan untuk membedakan analit dengan metabolit atau senyawa lainnya. Pada metode *immunoassay* memiliki nilai reaktivitas silang terhadap metabolit CBZ itu sendiri sehingga dapat dikatakan selektivitas metode *immunoassay* tidak baik dikarenakan memberikan hasil konsentrasi analit terlalu tinggi atau terlalu rendah (10). Dalam pengamatan yang dilakukan shen et al tahun 2001 dalam

menguji CBZ dan CBZE dengan 13 sistem *immunoassay* memberikan nilai perbedaan 1.35 mg/L, dengan delapan sistem analitik mendeteksi konsentrasi CBZ lebih tinggi dengan adanya CBZE (25). Namun *immunoassay* jenis EMIT yang memiliki nilai reaktivitas silang rendah dalam mengukur metabolit CBZ, dapat secara spesifik menganalisis CBZ atau CBZE saja, akan tetapi metode EMIT tidak disarankan untuk mengukur metabolit CBZ karena memberikan hasil konsentrasi yang buruk ataupun bias terbaca (52).

EMIT atau tes lain dengan reaktivitas silang rendah dengan CBZE mungkin memiliki efisiensi diagnostik yang tidak memadai karena aktivitas farmakologis CBZ dan CBZE yang sama (58). Sehingga untuk mendapatkan hasil selektivitas yang baik dalam menganalisis CBZ dan CBZE digunakan metode KCKT yang dapat membedakan analit dengan metabolit atau senyawa lainnya. Pada penelitian yang dilakukan Fortuna et al. menggunakan KCKT-UV mampu melakukan determinasi secara bersamaan karbamazepin, oxcarbazepin, eslikarbazepin, dan tiga metabolit karbamazepin dalam plasma dengan waktu pemisahan 10 menit. Pemisahan tersebut memberikan nilai LLoQ karbamazepin dan karbamazepin 10,11 epoksida berturut-turut 0,05 dan 0,1 mg/L dan dengan rentang linear karbamazepin dan karbamazepin 10,11 epoksida berturut-turut 0,05-30mg/L dan 0,1-30mg/L sehingga sesuai untuk praktek klinis (38). Pemisahan beberapa senyawa dalam analisis CBZ dan CBZE dengan senyawa lain juga sudah terdapat di rangkuman table 4.

Perbandingan Parameter Sensitivitas Dari Kedua Metode

Pada aplikasi PKOD parameter *sensitivitas* berperan dalam memberikan nilai konsentrasi CBZ dan CBZE yang berada di bawah rentan KEM (subdosis), berperan dalam mengatasi kejang pasien dan toksisitas obat. Pada penelitian yang dilakukan oleh dagusptas et al tahun 2004 menganalisis CBZ dengan metode FPIA mendapatkan nilai *sensitivitas* 0,5 mg/L (14). Penelitian yang dilakukan leitle pada tahun 2009 dengan membandingkan metode CLIA dengan KCKT mendapatkan perbedaan kuantifikasi 2,8 mg/L dengan KCKT lebih *sensitive* dalam menganalisis CBZ dan CBZE (17). Serta penelitian yang dilakukan pada paxton et al tahun 1982 menyatakan *sensitivitas* yang dilakukan dengan metode EMIT dan KCKT memberikan nilai kuantifikasi yang sama

yaitu 0,5 mg/L (57). Namun, selama metode bioanalisis mampu memiliki rentang kuantifikasi pada konsentrasi terapi CBZ, maka aplikasi tersebut sudah cukup untuk dapat digunakan dalam aplikasi PKOD. Akan tetapi berbeda jika aplikasi metode tersebut bertujuan dalam bidang lainnya yang membutuhkan tingkat *sensitivitas* metode analisis yang tinggi.

Perbandingan Efisiensi Antara *Immunoassay* Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Sebagai Metode Analisis Karbamazepin Dan Karbamazepin 10,11 – Epoksida.

Perbandingan Waktu Yang Dibutuhkan Dari Kedua Metode

Metode *immunoassay* dapat menganalisis dengan waktu yang cepat dibandingkan dengan KCKT (59). Pada beberapa penelitian yang terangkum pada table 4, total waktu yang diperlukan KCKT dalam menganalisis CBZ dan CBZE membutuhkan waktu 5-20 menit. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan deng et all tahun 1986 yang melakukan analisis CBZ dengan EMIT mendapatkan hasil dalam waktu yang lebih cepat dan pengerjaan yang sederhana untuk dilakukan daripada dengan menggunakan KCKT dan hasil *immunoassay* tersebut dapat digunakan untuk panduan klinis dalam mengevaluasi pasien yang dirawat (56).

Perbandingan Biaya Yang Dikeluarkan Dari Kedua Metode

PKOD merupakan aplikasi penting untuk menyesuaikan dosis obat dalam batas keamanan obat dan mengukur toksisitas klinis. Biaya menjadi kendala utama penerapan PKOD di Indonesia, dan mungkin di banyak negara berkembang lainnya. Sehingga diperlukan penyesuaian dalam penggunaan aplikasi PKOD untuk meminimalkan biaya yang dikeluarkan pasien. Pada penyiapan metode, biaya yang diperlukan untuk *immunoassay* lebih murah dibandingkan dengan KCKT yang memerlukan biaya yang tinggi serta membutuhkan keahlian khusus dan pengerjaan yang rumit. Namun, dalam pelaksanaan selanjutnya biaya kebutuhan dalam analisis KCKT lebih rendah (59). Dari sisi lain *immunoassay* memiliki reagen atau kit yang hanya dapat digunakan jangka pendek setelah kit terbuka.

KESIMPULAN

Dalam praktik klinis PKOD karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida, untuk kedua metode yang dibahas dalam artikel ini memiliki kemampuan analisis dengan korelasi yang baik dalam menggambarkan konsentrasi karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida, walaupun dengan kelebihan maupun kekurangan masing-masing metode. Kedua metode yang digunakan pada kajian ini sudah memenuhi persyaratan pada panduan bionalisis seperti FDA (*Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance*) dan EMA (*European medicines agency guideline on bioanalytical method validation*). Kajian ini juga tidak menentukan metode terbaik atau metode yang dapat menjadi pilihan utama. Namun kajian ini dibuat bertujuan untuk memberikan rekomendasi pertimbangan terhadap beberapa faktor yang perlu diperhatikan ketika salah satu metode menjadi pilihan dalam penentuan kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11 – epoksida pada pasien. Dalam tabel 6 merangkum kesimpulan.

Tabel 6. Kesimpulan

	Kriteria	Immunoassay	KCKT
Prosedur	Waktu	Cepat	Lama
	Pengerjaan	Sederhana	Kompleks
Perolehan Hasil	Akurasi	Lebih Baik	-
	Presisi	Lebih Baik	-
	Selektifitas	-	Lebih Baik
	Sensitivitas	-	Lebih Baik

Metode *immunoassay* dapat menjadi pilihan yang direkomendasikan jika analisis diperlukan cepat dan sederhana. Namun harus memperhatikan nilai reaktivitas silang jenis metode *immunoassay* yang digunakan. Seperti kondisi dalam menganalisis CBZ dan CBZE lebih disarankan menggunakan jenis metode *immunoassay* EMIT untuk mendapatkan hasil yang baik karena dapat membedakan kedua senyawa. Di sisi lain, metode KCKT dapat direkomendasikan pada analisis cairan biologis pasien yang memerlukan tingkat selektivitas dan sensitivitas metode tinggi. Hanya saja metode KCKT tidak dapat memberikan metode yang cepat dan pengerjaan yang mudah.

DAFTAR PUSTAKA

1. Goldenberg MM. Overview of drugs used for epilepsy and seizures: Etiology, diagnosis, and treatment. *P T*. 2010;35(7):392–415.
2. Tedyanto EH, Chandra L, Adam OM, Ilmu D, Syaraf P, Kedokteran F, et al. Gambaran Penggunaan Obat Anti Epilepsi (OAE) pada Penderita Epilepsi Berdasarkan Tipe Kejang di Poli Saraf Rumkital DR . *Ramelan Surabaya Overview of the Use of Anti-Epilepsy Drugs (OAE) in Patients with Epilepsy Based on the Type of Seizure in Poli S*. 2020;2071(November 2018):77–84.
3. Tuchila C, Vlasceanu AM. Therapeutic Drug Monitoring and Methods of Quantitation for Carbamazepine Therapeutic Drug Monitoring and Methods of Quantitation for. 2017;4(2).
4. Hubeis AA, Ismadi M. Pharmacokinetic profile of carbamazepine and its metabolites on Javanese and Chinese ethnics in Indonesia. 2010;21(1):1–7.
5. Grandgirard J, Poinot D, Krespi L, Nénon JP, Cortesero AM. Costs of secondary parasitism in the facultative hyperparasitoid *Pachycrepoideus dubius*: Does host size matter? *Entomol Exp Appl*. 2002;103(3):239–48.
6. Min KL, Ryu JY, Chang MJ. Development and clinical applications of the dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of anti-epileptic drugs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019;125(3):215–36.
7. Č PD, Č LŽ, Č ANAP, Č II, Č RVČKČ, Č MS, et al. Development and validation of a solid phase extraction-HPLC method for the determination of carbamazepine and its metabolites , carbamazepine epoxide and carbamazepine trans -diol , in plasma. 2012;77(10):1423–36.
8. Zhou S, Xu L, Liu L, Kuang H, Xu C. Development of a monoclonal antibody-based immunochromatographic assay for the detection of carbamazepine and carbamazepine-10, 11-epoxide. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci [Internet]*. 2020;1141(December 2019):122036. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122036>
9. Hazarika I. Therapeutic Drug Monitoring (TDM): An Aspect of Clinical Pharmacology and Pharmacy Practice. 2015;5(3):27–34.
10. Chiu NHL, Christopoulos TK. Advances in Immunoassay Technology. *Advances in Immunoassay Technology*. 2012.
11. Lawrence J. Blecka, PhD, and Glioria Jean Jackson P. Immunoassays in Therapeutic Drug Monitoring. 7(2):14.
12. Clarke W. Immunoassays for therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. *Handb Anal Sep*. 2020;7:97–114.
13. Datta P. Immunoassay design. *Accurate Results Clin Lab*. 2019;69–73.
14. Dasgupta A, McNeese C, Wells A. Interference of Carbamazepine and

- Carbamazepine 10,11-Epoxyde in the Fluorescence Polarization Immunoassay for Tricyclic Antidepressants: Estimation of the True Tricyclic Antidepressant Concentration in the Presence of Carbamazepine Using A Mathematical Model. *Am J Clin Pathol.* 2004;121(3):418–25.
15. P. Patrick Hess, Mary Ann Stone, and Roland Valdes J. Demonstrating Instrument-Reagent Flexibility : A Carbamazepine Enzyme Immunoassay Reagent System. *Ther Drug Monit.* 1993;15(2):5.
 16. Contin M, Riva R, Albani F, Perucca E, Baruzzi A. Determination of Total and Free Plasma Carbamazepine Concentrations by Enzyme Multiplied Immunoassay. Vol. 7, *Therapeutic Drug Monitoring.* 1985. p. 46–50.
 17. Leite CE, Petersen GO, Lunardelli A, Thiesen FV. A high-performance liquid chromatography method for the determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide and its comparison with chemiluminescent immunoassay. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(4):458–63.
 18. Dasgupta A, Reyes MA, Davis BG, Marlow AM, Johnson M. Analytical performance evaluation of ADVIA chemistry carbamazepine-2 assay: minimal cross-reactivity with carbamazepine 10, 11-epoxide and none with hydroxyzine or cetirizine. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(4):278–82.
 19. McMillin GA, Juenke JM, Tso G, Dasgupta A. Estimation of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide concentrations in plasma using mathematical equations generated with two carbamazepine immunoassays. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(5):728–36.
 20. Mcmillin GA, Juenke JM, Johnson MJ, Dasgupta A. Discordant carbamazepine values between two immunoassays: Carbamazepine values determined by ADVIA centaur correlate better with those determined by LC-MS/MS than PETINIA assay. *J Clin Lab Anal.* 2011;25(3):212–6.
 21. Parant F, Bossu H, Gagnieu MC, Lardet G, Moulisma M. Cross-reactivity assessment of carbamazepine-10,11-epoxide, oxcarbazepine, and 10-hydroxycarbazepine in two automated carbamazepine immunoassays: PETINIA and EMIT 2000. *Ther Drug Monit.* 2003;25(1):41–5.
 22. Datta P, Scurlock D, Dasgupta A. Analytic performance evaluation of a new turbidimetric immunoassay for phenytoin on the ADVIA 1650® analyzer: Effect of phenytoin metabolite and analogue. *Ther Drug Monit.* 2005;27(3):305–8.
 23. Hermida J, Tutor JC. How suitable are currently used carbamazepine immunoassays for quantifying carbamazepine-10,11-epoxide in serum samples? *Ther Drug Monit.* 2003;25(3):384–8.
 24. Hermida J, Dolores Bóveda M, Javier Vadillo F, Carlos Tutor J. Comparison between the Cobas Integra immunoassay and high-performance liquid chromatography for therapeutic monitoring of carbamazepine. *Clin Biochem.* 2002;35(3):251–4.

25. Shen S, Elin RJ, Soldin SJ. Characterization of cross reactivity by carbamazepine 10,11-epoxide with carbamazepine assays. *Clin Biochem.* 2001;34(2):157–8.
26. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish J Emerg Med.* 2018;18(3):91–3.
27. Aldaz A, Ferriols R, Aumente D, Calvo M V., Farre MR, García B, et al. Pharmacokinetic monitoring of antiepileptic drugs. *Farm Hosp.* 2011;35(6):326–39.
28. Siouffi AM. High performance liquid chromatography. *Handb Food Sci Technol Eng - 4 Vol Set.* 2005;859–900.
29. Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Rocha M, Falcão A. First HPLC-UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plas. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci [Internet].* 2013;925:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.026>
30. Breton H, Cociglio M, Bressole F, Peyriere H, Pierre J, Hillaire-buys D. Liquid chromatography – electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *J Chromatogr B.* 2005;828(1–2):80–90.
31. Ezzeldin E, Shahtat AA, Basudan OA. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Carbamazepine in Human Plasma. *Life Sci J.* 2013;10(4):2159–63.
32. Shimoyama R, Ohkubo T, Sugawara K. Monitoring of carbamazepine and carbamazepine 10, 11-epoxide in breast milk and plasma by high-performance liquid chromatography. *Ann Clin Biochem.* 2000;37(2):210–5.
33. Mandrioli R, Albani F, Casamenti G, Sabbioni C, Raggi MA. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;762(2):109–16.
34. Đorđević S, Kilibarda V, Stojanović T. Determination of carbamazepine in serum and saliva samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Određivanje karbamazepina u uzorcima seruma i salive primenom tehnike hromatografije visokih performansi sa ultravioletnom detekcijom.* *Vojnosanit Pregl.* 2009;66(5):347–52.
35. Satinder Ahuja and Henrik Rasmussen. *HPLC Method Development For Pharmaceuticals.* 2007.
36. Kumar V, Bharadwaj R, Gupta G, Kumar S. CODEN(USA): PCJHBA An Overview on HPLC Method Development, Optimization and Validation process for drug analysis. *Pharm Chem J.* 2015;2(2):30–40.
37. Bhatti MM, Hanson GD, Schultz L. Simultaneous determination of phenytoin,

- carbamazepine, and 10,11- carbamazepine epoxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;16(7):1233–40.
38. Fortuna A, Sousa J, Alves G, Falcão A, Soares-Da-Silva P. Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(4):1605–15.
 39. Kishore P, Rajnarayana K, Reddy MS, Sagar JV, Krishna DR. Validated High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Phenytoin, Phenobarbital and Carbamazepine in Human Serum. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 2003;53(11):763–8.
 40. Oh EK, Ban E, Woo JS, Kim CK. Analysis of carbamazepine and its active metabolite, carbamazepine-10,11- epoxide, in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2006;386(6):1931–6.
 41. Budakova L, Brozmanova H, Grundmann M, Fischer J. Simultaneous determination of antiepileptic drugs and their two active metabolites by HPLC. *J Sep Sci.* 2008;31(1):1–8.
 42. Levert H, Odou P, Robert H. Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in serum by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2002;16(1):19–24.
 43. Yoshida T, Imai K, Motohashi S, Hamano S ichiro, Sato M. Simultaneous determination of zonisamide, carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in infant serum by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(4):1386–90.
 44. Queiroz RHC, Bertucci C, Malfará WR, Dreossi SAC, Chaves AR, Valério DAR, et al. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(2):428–34.
 45. Rani S, Malik AK, Singh B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *J Sep Sci.* 2012;35(3):359–66.
 46. Moosa RS, McFadyen ML, Miller R, Rubin J. Carbamazepine and its metabolites in neuralgias: concentration-effect relations. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;45(4):297–301.
 47. Patil KM, Bodhankar SL. Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39(1–2):181–6.
 48. Franceschi L, Furlanut M. A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacol Res.* 2005;51(4):297–302.

49. Heideloff C, Bunch DR, Wang S. A novel HPLC method for quantification of 10 antiepileptic drugs or metabolites in serum/plasma using a monolithic column. *Ther Drug Monit.* 2010;32(1):102–6.
50. Burianová I, Bořecká K. Routine therapeutic monitoring of the active metabolite of carbamazepine: Is it really necessary? *Clin Biochem.* 2015;48(13–14):866–9.
51. Carbamazepine Measurement in Samples from the Emergency Room. *Ther Drug Monit.* 1994;16(4):6.
52. Elyas AA, Ratnaraj N, Goldberg VD, Lascelles PT. Routine monitoring of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in plasma by high-performance liquid chromatography using 10-methoxycarbamazepine as internal standard. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1982;231(1):93–101.
53. Tutor-Crespo MJ, Hermida J, Tutor JC. Relative proportions of serum carbamazepine and its pharmacologically active 10, 11-epoxy derivative: Effect of polytherapy and renal insufficiency. *Ups J Med Sci.* 2008;113(2):171–80.
54. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance. *Food Drug Adm* [Internet]. 2018;1043(May):25. Available from: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
55. Smith G. European medicines agency guideline on bioanalytical method validation: What more is there to say? *Bioanalysis.* 2012;4(8):865–8.
56. Jou-Fang Deng, MD, James R. Shipe Jr., PhD, Alan D. Rogol, MD, PhD, Leigh Donowitz, MLI and Daniel A. Spyker, PhD M. Carbamazepine Toxicity: Comparison Of Measurement Of Drug Level by HPLC and EMIT and Model of Carbamazepine Kinetics. *Concept Commun.* 1986;null(23):301–16.
57. Paxton JW. Carbamazepine Determination in Saliva of Children: Enzyme Immunoassay (EMIT®) Versus High Pressure Liquid Chromatography. *Epilepsia.* 1982;23(2):185–9.
58. Dasgupta A. Immunoassays and Issues With Interference in Therapeutic Drug Monitoring [Internet]. *Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring: Special Populations, Physiological Conditions, and Pharmacogenomics.* Elsevier Inc.; 2016. 17–44 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802025-8.00002-7>
59. Setiabudy R. Therapeutic drug monitoring: focus on conditions in Indonesia. *Acta Med Indones.* 2011;43(3):208–11.