BIOFARMASI

M.T.SIMANJUNTAK

Jurusan Farmasi
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Sumatera Utara

BAB I. PHYSIOLOGIS DARI DISTRIBUSI OBAT DAN IKATAN PROTEIN.

I. 1. Faktor physiologis.

Bila obat di absorbsi atau diinjeksi kedalam aliran darah, molekul obat akan terdistribusi keseluruh bahagian tubuh melalui sirkulasi sistemik. Molekul obat akan dibawa oleh darah sampai ke target site = tempat target (reseptor) untuk obat bekerja dan kejaringan lain (bukan reseptor). Konsentrasi obat dalam tempat bukan target (untarget site) dapat menyebabkan efek samping. Beberapa molekul obat didistribusi kedalam organ tempat eliminasi, seperti *hati* dan *ginjal*; yang lainnya didistribusi ke jaringan, seperti *otak, kulit*, dan *otot*. Ada obat akan melintasi *plasenta* dan mungkin menyebabkan efek terhadap *fetus*; Obat lain akan disekresi kedalam susu pada kelenjar air susu. Bahagian terpenting dari obat mungkin berikatan dengan protein dalam plasma dan /atau jaringan. Obat yang bersifat *lipophilik* akan disimpan dalam lemak, dari sini obat akan dilepaskan secara perlahan lahan.

Sistem sirkulasi terdiri dari berbagai pembuluh darah; yang meliputi; *arteri*, yang kan membawa darah ke jaringan, dan *vena*, yang akan mengembalikan darah ke jantung. Untuk manusia dengan berat rata rata 70 kg, mempunyai kira kira 5 kg darah, yang equivalen dengan 3 liter darah. Hampir 50 % dari darah berada dalam *vena besar* atau *vena sinuses*. Jumlah volume darah yang dipompa jantung per menit = cardiac output adalah hasil dari volume stroke dari jantung dan jumlah denyut jantung per menit. Rata rata Cardiac output adalah sebesar 0,08 L/min x 69 denyutan/menit, atau kira kira 5,5 L/menit pada manusia saat istirahat. Pada saat bekerja, cardiac output mungkin akan meningkat sebesar 5 sampai 6 kali. Kontraksi dari ventricular kiri dapat menghasilkan tekanan darah *sistolik* sebesar 125 mm Hg, dan menggerakkan darah melalui *aorta* dengan kecepatan liner sebesar 300 mm/ detik. Campuran larutan obat dalam darah ditemukan dengan cepat pada kecepatan alir ini. Molekul obat dengan cepat akan terdifusi melalui jalinan kapiler halus sampai permukaan jaringan yang berisi Cairan interstisial (*interstitial fluid*). Cairan interstisial bersama dengan air plasma disebut : air extrasellular (extracellular water) sebab terdapat diluar sel. Lebih lanjut molekul obat dapat terdifusi dari cairan intertitial melalui membran sel kedalam sel citoplasma. Distribusi obat umumnya cepat, dan hampir seluruh molekul obat yang kecil akan mudah menembus membran kapiler. Perjalanan obat melalui membran sel tergantung kepada sifat fisika kimia dari obat maupun membran sel. Membran sel tersusun dari protein dan *2 (dua) lapis phospholipid* yang bekerja sebagai dinding pelindung (*barrier*) lipid terhadap uptake obat. Sehingga, obat yang larut dalam lemak umumnya lebih mudah terdifusi melalui membran sel daripada obat yang mudah larut dalam air atau mempunyai polaritas yang tinggi. Obat dengan molekul yang kecil umumnya terdifusi lebih cepat melalui sel membran, daripada obat dengan molekul besar. Bila obat berikatan dengan

©2003 Digitized by USU digital library

plasma protein seperti *albumin*, maka kompleks obat-protein menjadi sangat besar untuk mudah terdifusi melalui sel membran. Perbandingan kecepatan difusi untuk molekul yang larut dalam air terlihat seperti tabel berikut :

Tabel 1. Permeability of Molecules of Various Sizes to Capillaries

	MOLECULAR WEIGHT	RADIUS OF EQUIVALENT SPHERE (A)	DIFFUSION COEFFICIENT IN WATER (cm^2/sec) × 10^5	DIFFUSION COEFFICIENT ACROSS CAPILLARY (cm^2/sec × 100 g)
Water	18		3.20	3.7
Urea	60	1.6	1.95	1.83
Glucose	180	3.6	0.91	0.64
Sucrose	342	4.4	0.74	0.35
Raffinose	594	5.6	0.56	0.24
Inulin	5,500	15.2	0.21	0.036
Myoglobin	17,000	19	0.15	0.005
Hemoglobin	68,000	31	0.094	0.001
Serum albumin	69,000		0.085	<0.001

From Goldstein et al (1974).

I. 2. Pengikatan protein terhadap obat (Protein binding of drugs).

Berbagai obat mengadakan interaksi dengan plasma atau jaringan protein atau dengan makromolekul yang lain seperti melanin dan DNA, membentuk kompleks makromolekul obat. Formasi kompleks obat protein disebut: *protein–binding* (pengikatan protein terhadap obat) dan mungkin merupakan proses *reversible* (dapat balik) atau *irreversible* (tidak dapat balik). Ikatan obat dengan protein yang tidak dapat balik (*irreversible drug- protein binding*) umumnya merupakan hasil dari aktifasi kimia obat, dimana kemudian mengadakan pengikatan yang kuat terhadap protein atau makromolekul dengan ikatan kimia kovalen. Pengikatan obat yang tidak dapat balik (irreversible), yang ditemukan dalam waktu yang cukup lama dapat menyebabkan berbagai jenis keracunan obat, seperti kasus karsinogenesis kimia, atau dalam jangka waktu yang pendek, seperti dalam kasus obat dalam bentuk perantara (intermediated) kimia yang reaktip, misalnya: *Hepatotoksisitas* dari *dosis tinggi acetaminophen*, yang akan membentuk metabolit antara (intermediated metabolite) reaktip yang berinteraksi dengan protein hati. Umumnya obat akan berikatan atau membentuk kompleks dengan protein melalui proses bolak balik (reversibel). Ikatan obat-protein yang bolak balik menyatakan secara tidak langsung bahwa obat mengikat protein dengan ikatan kimia yang lemah, misalnya; ikatan hydrogen atau ikatan van deer waals. Asam amino yang menyusun rantai protein mempunyai gugus hydroxyl, carboxyl, atau berbagai tempat yang ada, untuk interaksi obat yang bolak balik. Obat dapat mengikat berbagai komponen makromolekuler dalam darah, meliputi: albumin, a_1-asam glycoprotein, lipoprotein, immunoglobulin (IgG), erythrocyte (RBC).

Albumin adalah komponen terbesar dari plasma protein yang berperanan dalam pengikatan obat yang bolak balik (tabel 2). Dalam tubuh, albumin terdistribusi dalam plasma dan dalam cairan ekstrasellular dan kulit, otot dan berbagai jaringan lain. Konsentrasi albumin dalam cairan intertitial adalah sekitar 60 % dari yang ada pada plasma. Waktu paruh dari eliminasi albumin adalah 17–18 hari. Konsentrasi albumin normal dipertahankan pada tingkatan yang relatif tetap yaitu 3,5% sampai 5,5%

(berat per volume) atau 4,5 mg/dL. Albumin berperanan untuk mempertahankan tekanan osmosa darah dan untuk transpor bahan eksogen dan endogen. Sebagai protein transpor untuk bahan endogen, albumin akan membentuk kompleks dengan asam lemak bebas (FFA), bilirubin, berbagai hormon (seperti cortisone, aldosterone, dan thyroxine), tryptophan, dan senyawa lain. Banyak obat yang bersifat asam lemah (anionic) berikatan dengan albumin dengan ikatan elektrostatik dan hydrophobic. Obat yang bersifat asam lemah seperti : salisilat, phenylbutazon, dan penicillin sangat cepat berikatan dengan albumin. Namun, kekuatan dari pengikatan obat berbeda untuk setiap obat.

a_1-asam glycoprotein (orosomucoid) adalah globulin dengan berat molekul sekitar 44.000 d. Konsentrasi a_1-asam glycoprotein dalam plasma sangat rendah (0,4 sampai 1 %) dan terutama mengikat obat yang bersifat basa (kationik) seperti propranolol, imipramine, dan lidocaine. *Globulin* (a, ß ,? globulin) mungkin berperanan untuk transpor berbagai bahan endogen seperti corticosteroid. *Globulin* mempunyai kapasitas yang rendah tetapi mempunyai affinitas yang tinggi untuk mengikat bahan endogen ini.

Tabel 2. Protein utama tempat ikatan obat pada plasma.

Protein	Berat molekul (D)	Konsentrasi normal (g/ L)	Konsentrasi normal (mol / L)
Albumin	65.000	35 – 50	5 – 7,5 x 10^{-4}
a_1-asam glycoprotein	44.000	0,4 – 1,0	0,9 – 2,2 x 10^{-5}
Lipoprotein	200.000 – 3.400.000		bervariasi

Lipoprotein adalah kompleks makromolekul dari lipid dan protein, dan diklasifikasikan berdasarkan atas densitas dan pemisahan dengan ultrasentrifuge. Istilah VLDL, LDL, dan HDL adalah singkatan dari : *very-low-density lipoprotein, low-density lipoprotein, dan high-density lipoprotein.* Lipoprotein berperan untuk transpor plasma lipid dan mungkin berperan dalam pengikatan obat bila tempat albumin telah jenuh.

Erythrocytes atau sel darah merah (RBCs), dapat mengikat baik senyawa endogen dan eksogen. Kira kira 45% dari volume darah merupakan RBCs. Phenytoin, pentobarbital, dan amobarbital diketahui mempunyai rasio RBC/air plasma = 4 sampai 2, yang menunjukkan pengikatan istimewa dari obat pada erythrocytes lebih dari air plasma. Penetrasi kedalam erythrocytes tergantung pada konsentrasi bebas obat . Untuk *Phenytoin*, level obat dalam RBC meningkat secara liner dengan peningkatan konsentrasi obat bebas dalam plasma (Borondy et al 1973). Untuk hampir pada semua obat peningkatan pengikatan obat pada albumin plasma akan mengurangi konsentrasi obat dalam RBC. Namun,pengikatan obat pada RBC umumnya tidak berpengaruh terhadap volume distribusi, sebab obat selalu berikatan dengan albumin pada air plasma. Meskipun phenytoin mempunyai affinitas yang besar untuk RBC, hanya sekitar 25% dari konsentrasi obat dalam darah yang terdapat pada sel darah, dan 75% terdapat dalam plasma sebab obat sangat kuat berikatan dengan albumin. Untuk obat yang berikatan sangat kuat dengan

©2003 Digitized by USU digital library

erythrocytes, maka hematocrit akan mempengaruhi jumlah total obat dalam darah. Untuk obat ini, konsentrasi obat total dalam seluruh darah harus ditentukan.
Pengikatan obat –protein yang bolak balik (*reversible*) sangat penting dalam pharmakokinetik. Ikatan obat-protein merupakan kompleks yang besar, sehingga tidak mudah melalui sel membran dan oleh karena itu akan *terbatas terdistribusi.* Selanjutnya, ikatan obat-protein biasanya secara pharmakologi *inaktif*. Sebaliknya, obat yang tidak berikatan atau bebas dapat melalui membran sel serta *aktif* untuk pengobatan. Penelitian yang mengevaluasi secara mendetail pengikatan obat-protein biasanya dilakukan secara *in-vitro* mempergunakan protein yang telah dimurnikan seperti, albumin. Metode untuk pemeriksaaan pengikatan protein, meliputi dialysis kesetimbangan dan ultrafiltrasi, yang mempergunakan membrane semipermiabel yang akan memisahkan protein dan ikatan obat-protein dari obat yang terikat atau yang bebas (tabel. 3). Dengan metode ini, dapat ditentukan konsentrasi obat terikat, obat bebas, dan total protein.

Tabel 3. Metode untuk pemeriksaan pengikatan obat-protein.

* Dialysis kesetimbangan	* Kromatografi gel
* Dialysis dinamik	* Spektrofotometri
* Diafiltrasi	* Elektroforesis
* Ultrafiltrasi	* Optical rotatory dispersion dan circulatory dichroism

Setiap metode untuk pemeriksaan ikatan obat-protein secara *in-vitro* mempunyai kebaikan dan keburukan bila ditinjau dari segi biaya, kemudahan penentuan , waktu, peralatan, dan pertimbangan lainnya. Kinetika pengikatan obat-protein merupakan informasi yang digunakan untuk pengunaan terapi dan memprediksi kemungkinan interaksi obat.
Berbagai faktor percobaan untuk menentukan ikatan protein diringkaskan dalam tabel 4 seperti dibawah ini :

Tabel 4. Pertimbangan dalam penelitian ikatan obat-protein.

- Harus diperoleh kesetimbangan antara obat yang terikat dan yang bebas.
- Metode harus sahih pada konsentrasi protein dan obat yang digunakan.
- Pengotoran pada ikatan obat atau adsorbsi obat dari dinding alat, membran, atau komponen lain harus dihilangkan atau harus diperhatikan dalam metode yang dipakai.
- Harus dicegah denaturasi protein atau kontaminasi protein.
- Metode harus telah mempertimbangkan pH dan konsentrasi ionik dari media dan efek donnan dari protein.
- Metode harus dapat digunakan untuk mendeteksi baik ikatan obat yang bolak balik ataupun yang searah, termasuk fase assosiasi yang cepat dan yang lambat serta disosiasi obat dan protein.
- Metode tidak akan memakai bahan yang dapat bereaksi seperti pelarut organik.
- Hasil dari metode in-vitro harus dapat diektrapolasi kedalam keadaan in-vivo.

Sumber : Bridges dan Wilson (1976)

©2003 Digitized by USU digital library

Pengikatan obat-protein dipengaruhi oleh sejumlah factor yang penting, meliputi :

1. Obat
   - Sifat fisika kimia dari obat
   - Konsentrasi total obat dalam tubuh

2. Protein
   - Jumlah protein yang berguna untuk pengikatan obat-protein
   - Kualitas atau fisiko kimia alamiah dari protein hasil sintesa

3. Affinitas antara obat dan protein
   - Meliputi besarnya tetapan asosiasi.

4. Interaksi obat
   - Kompetisi antara obat oleh bahan lain pada tempat pengikatan protein.
   - Pergantian protein dengan bahan yang akan memodifikasi affinitas obat terhadap protein. Contoh : aspirin acetylasi lysine sisa albumin.

5. Kondisi pathophysiologi dari pasien
   - Sebagai contoh, Pengikatan obat-protein mungkin berkurang pada pasien uremik dan pada pasien dengan penyakit hati.

Konsentrasi obat dalam plasma umumnya dinyatakan sebagai total konsentrasi obat dalam plasma, meliputi baik konsentrasi ikatan obat-protein maupun konsentrasi obat bebas (tidak berikatan). Dalam literatur umumnya nilai untuk konsentrasi efektip terapi obat diperoleh dari konsentrasi total obat dalam plasma atau serum. Untuk monitoring terapi obat, total konsentrasi obat dalam plasma umumnya digunakan untuk menemukan kira kira dosis regimen untuk pasien. Dahulu, penentuan konsentrasi obat bebas tidak secara rutin dilakukan dalam laboratorium. Saat ini, konsentrasi obat bebas mungkin ditentukan secara cepat mempergunakan *ultrafiltrasi*. Sebab pengikatan protein plasma dari phenytoin tinggi dan indek terapi obat sempit, maka laboratorium rumah sakit selalu menentukan baik phenytoin plasma bebas maupun total.

I. 3. Kinetika dari pengikatan protein.

Kinetika dari pengikatan obat-protein secara bolak balik (reversibel) dengan 1 (satu) tempat pengikatan sederhana dapat diterangkan dengan hukum kerja massa (*law of mass action*) sebagai berikut:

$$\text{Protein} + \text{Obat} \rightleftharpoons \text{Kompleks-obat-protein.}$$

Atau

$$(P) + (D) \rightleftharpoons (PD) \quad \ldots\ldots\ldots\ldots 1)$$

Dari persamaan 1) dan hukum kerja massa, tetapan assosiasi, K_a dapat dinyatakan sebagai rasio dari konsentrasi molar hasil dan konsentrasi molar dari yang bereaksi. Persamaan ini menganggap hanya 1 (satu) tempat berikatan per molekul protein.

©2003 Digitized by USU digital library

$$K_a = \frac{(PD)}{(P)\ (D)} \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ 2)$$

Adanya bentuk kompleks obat-protein tidak tergantung pada tetapan asosiasi ikatan K_a. Besarnya K_a memberikan informasi pada derajat ikatan protein obat. Obat yang berikatan secara kuat dengan protein mempunyai K_a yang sangat besar dan selalu dalam bentuk kompleks obat-protein. Untuk obat jenis ini, dosis yang tinggi mungkin dibutuhkan untuk memperoleh konsentrasi terapi obat bebas yang rasional. Umumnya penelitian untuk kinetika secara *in-vitro* digunakan *albumin* yang murni sebagai sumber protein baku, sebab protein ini berperanan untuk bahagian terbesar pengikatan obat-plasma protein. Secara percobaan, baik obat bebas (D) dan ikatan obat-protein (PD), demikian juga total konsentrasi protein (P) + (PD) , mungkin dapat ditentukan. Untuk mempelajari sifat ikatan obat, rasio yang dapat ditentukan (r), dapat diperoleh sebagai berikut :

$$r = \frac{\text{Mol ikatan obat}}{\text{Total Mol protein}}$$

Sebab mol dari pengikatan obat adalah (PD) dan total mol protein adalah (P) + (PD), maka persamaan menjadi :

$$r = \frac{(PD)}{(PD) + (P)} \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots 3)$$

Berdasarkan persamaan 2) maka, (PD) = K_a (P) (D): Bila harga ini disubsitusikan kedalam persamaan 3) akan diperoleh :

$$r = \frac{K_a (P)(D)}{K_a (P)(D) + (P)}$$

$$r = \frac{K_a (D)}{1 + K_a (D)}$$

Persamaan inidalam keadaan yang sederhana, dimana 1 mol obat berikatan dengan 1 mol protein dalam kompleks 1 : 1. Dalam hal ini diduga hanya satu tempat pengikatan yang bebas untuk setiap molekul obat. Bila ada *n* tempat pengikatan bebas yang sama per molekul protein, maka digunakan persamaan berikut :

$$r = \frac{n K_a (D)}{1 + K_a (D)} \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots 4)$$

Molekul protein adalah sangat besar dibandingkan dengan molekul obat dan dapat mengandung lebih dari satu tipe tempat pengikatan untuk obat. Bila ada lebih dari satu tipe tempat pengikatan dan obat berikatan bebas pada setiap tempat pengikatan dengan masing masing tetapan asosiasi , maka persamaan 4) dapat diperluas menjadi :

$$r = \frac{n_1 K_1 (D)}{1 + K_1 (D)} + \frac{n_2 K_2 (D)}{1 + K_2 (D)} + \ldots\ldots \qquad \ldots\ldots 5)$$

Dimana urutan angka memperlihatkan perbedaan tipe tempat pengikatan, Ks memperlihatkan tetapan pengikatan, dan ns menunjukkan jumlah tempat pengikatan per molekul albumin. Persamaan ini menduga bahwa setiap molekul obat berikatan dengan protein pada tidak tergantung tempat pengikatan, dan affinitas obat untuk satu tempat pengikatan tidak memepengaruhi pengikatan terhadap tempat yang lain. Secara nyata, pengikatan obat-protein kadang kadang memperlihatkan phenomena *koperatifitas*. Untuk obat seperti ini, pengikatan molekul obat pertama pada satu tempat pada molekul protein mempengaruhi pengikatan selanjutnya molekul obat yang lain. Contoh obat yang bersifat *koperatif* adalah pengikatan oxygen pada haemoglobine.

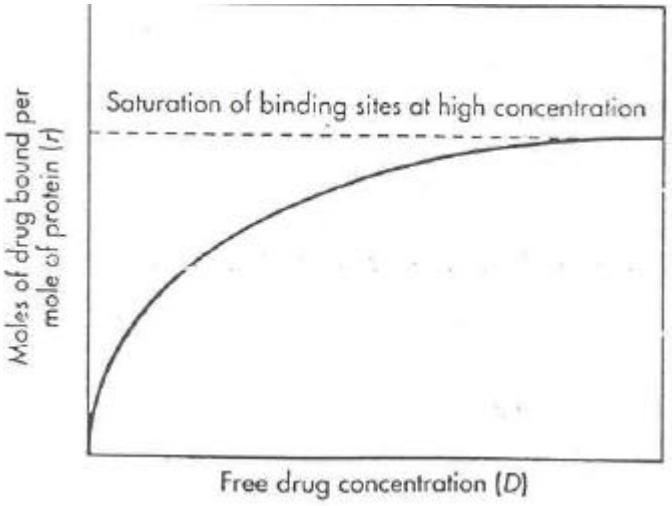
Bila $K_d = 1/K_a$, maka persamaan 4) menjadi :

$$r = \frac{n (D)}{K_d + (D)} \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots 6)$$

I. 4. Penentuan tetapan dan tempat pengikatan dengan metode grafik.

I. 4. 1. Metode *in vitro* (konsentrasi protein diketahui)

Grafik dari rasio *r* (pengikatan mol obat per mol protein) *versus* konsentrasi obat bebas (D) dapat dilihat pada gbr. 1.



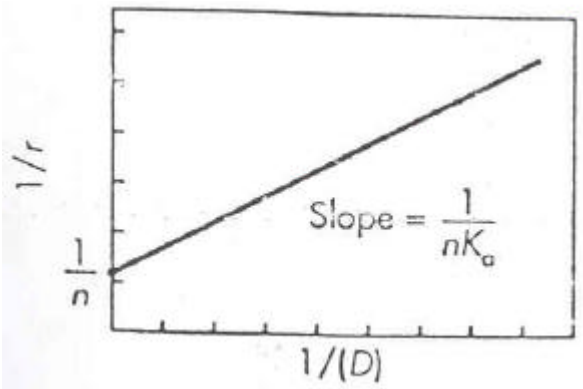
Persamaan 4) memeperlihatkan bahwa bila konsentrasi obat bebas akan meningkat, maka jumlah mol obat yang berikatan per mol protein menjadi jenuh dan mendatar.

Sehingga, pengikatan obat protein mirip *absorbsi isotherm Langmuir*, dimana juga sama dengan adsorbsi obat terhadap adsorben menjadi jenuh bila konsentrasi obat meningkat. Sesuai dengan *non linearitas* daripada pengikatan protein obat, maka persamaan 4) dapat disusun kembali untuk mengestimasi *n* dan K_a, mempergunakan berbagai metode grafik seperti yang dibicarakan berikut. Bentuk kebalikan dari persamaan 4) akan menghasilkan persamaan sebagai berikut :

$$\frac{1}{r} = \frac{1 + K_a (D)}{n K_a (D)} \qquad \text{..... 7)}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n K_a (D)} + \frac{1}{n}$$

Grafik 1/r versus 1/ (D) disebut : *Double reciprocal plot.* Intersep *y* adalah 1/*n* dan slope adalah 1 / nK_a, seperti terlihat pada gbr 2. Dari gambar ini, jumlah tempat pengikatan mungkin ditentukan dari intersep *y*, dan tetapan asosiasi mungkin ditentukan dari slope, apabila harga *n* diketahui. Bila grafik dari 1/r versus 1/ (D) tidak menghasilkan garis lurus, maka proses pengikatan obat-protein kemungkinan lebih kompleks. Persamaan 4) menduga adanya satu tipe tempat pengikatan dan tidak ada interaksi diantara tempat pengikatan. Umumnya, persamaan 7) digunakan mengestimasi jumlah tempat pengikatan dan tetapan pengikatan, mempergunakan metode komputerisasi.



Gambar 2. Pengikatan hipotetis obat pada protein. Garis diperoleh dengan persamaan double reciprocal.

Metode grafik yang lain disebut : *Scatchard plot* yaitu dengan mengatur kembali persamaan 4). Scatchard plot akan menguraikan data untuk menghasilkan garis yang lebih baik untuk mengestimasi tetapan pengikatan dan tempat pengikatan.

©2003 Digitized by USU digital library

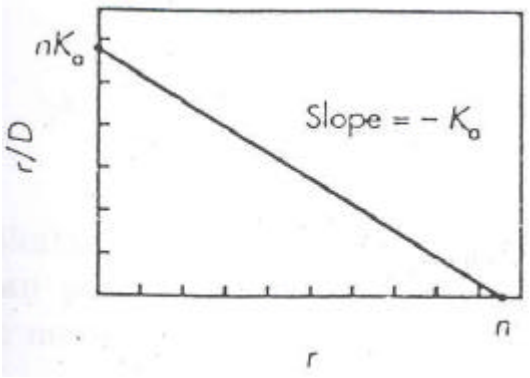
$$r = \frac{nK_a\ (D)}{1 + Ka\ (D)} \qquad \text{..... 8)}$$

$$r + rK_a\ (D) = n\ Ka\ (D)$$

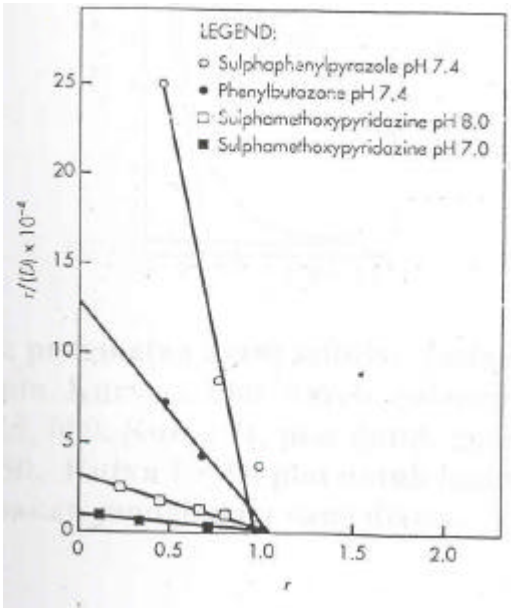
$$r = n\ K_a\ (D) - r\ K_a\ (D)$$

$$\frac{1}{(D)} = nK_a - rK_a.$$

Grafik diperoleh dengan memplot r / (D) versus r menghasilkan garis lurus dengan intersep dan slope seperti yang terlihat pada gbr 3 dan 4.



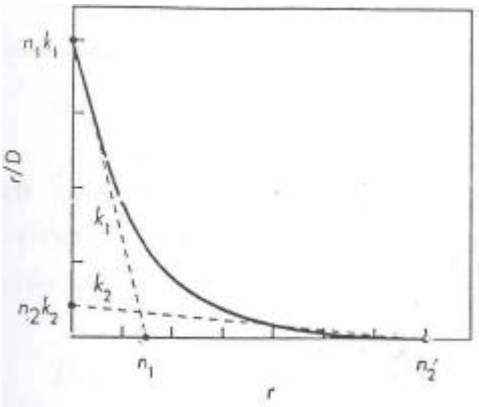
Gambar 3. Pengikatan hipotetis dari obat pada protein. Garis diperoleh dengan persamaan scatchard.



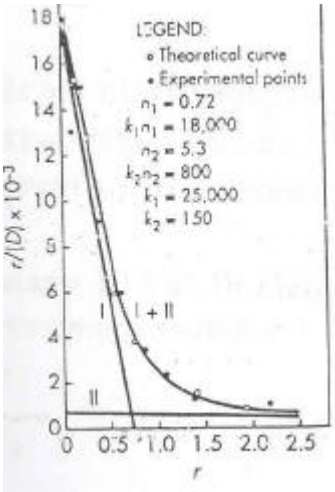
Gambar 4. Grafik penentuan jumlah tempat pengikatan dan tetapan assosiasi untuk interaksi sulfonamide dan phenylbutazon dengan albumin.

©2003 Digitized by USU digital library

Beberapa data pengikatan obat –protein menghasilkan grafik scatchard berupa garis *curvilinear* (gbr. 5 dan 6). Garis *curvilinear* memperlihatkan penyajian terakhir dari dua garis lurus yang secara kolektip membentuk kurva. Pengikatan dari asam salisilat terhadap albumin merupakan contoh tipe pengikatan obat –protein dimana sedikitnya ada 2 (dua) tempat pengikatan yang berbeda dan tidak tergantung satu dengan yang lain (n_1 dan n_2), masing masing dengan tetapan assosiasi yang tidak tergantung satu sama lain (k_1 dan k_2) . Persamaan 5) sangat baik menerangkan tipe interaksi obat-protein ini.



Gambar 5. Pengikatan hipotetis obat pada protein. K_s merupakan tetapan pengikatan yang tidak tergantung dengan yang lain, dan *ns* merupakan tempat pengikatan per mol protein.



Gambar 6. Kurva pengikatan asam salisilat pada kristal bovine serum albumin. Kurva I. Plot untuk golongan pertama, n = 0,72 ; k_1 = 25. 000. Kurva II, plot untuk golongan kedua, n_2 = 5,3, k_2 = 150. Kurva I + II, plot untuk kedua tempat pengikatan, merupakan jumlah dari yang diatas.

I. 4. 2. Metode *in vivo* (konsentrasi protein tidak diketahui).

Plot kebalikan dan scatchard tidak dapat digunakan bila sifat alamiah dan jumlah pasti dari protein dalam sistem percobaan tidak diketahui. Persen pengikatan obat selalu digunakan untuk menunjukkan keberadaan ikatan obat-protein dalam plasma. Fraksi dari pengikatan obat ß, dapat ditentukan secara percobaan dan sama dengan

©2003 Digitized by USU digital library

rasio konsentrasi pengikatan obat, $D_ß$, dan konsentrasi total obat D_T dalam plasma, sebagai berikut :

$$ß = \frac{D_ß}{D_T} \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots 9)$$

Nilai dari tetapan assosiasi dapat ditentukan, meskipun sifat alamiah pengikatan obat-protein plasma tidak diketahui, dengan cara menata ulang kembali persamaan 9) menjadi persamaan 10)

$$r = \frac{D_ß}{P_T} = \frac{n\ K_a\ (D)}{1 + K_a\ (D)} \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots 10)$$

Dimana :

$D_ß$: Konsentrasi obat yang berikatan.
D : Konsentrasi obat bebas.
P_T : Konsentrasi total protein.

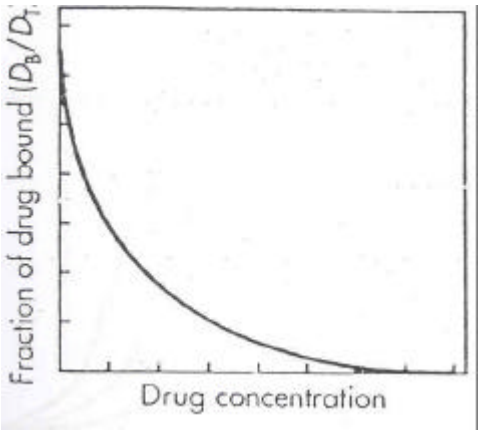
Penataan ulang persamaan 10) akan menghasilkan persamaan berikut, yang analog dengan *persamaan scatchard.*

$$\frac{D_ß}{(D)} = n\ K_a\ P_T - K_a\ D_ß \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots 11)$$

Konsentrasi baik obat bebas atau obat yang berikatan mungkin diperoleh secara percobaan, dan grafik diperoleh dengan cara menplot $D_ß/(D)$ versus $D_ß$, akan dihasilkan garis lurus dan slope merupakan tetapan assosiasi K_a.
Persamaan 11) memperlihatkan rasio dari C_P yang terikat dan C_P yang bebas dipengaruhi oleh tetapan affinitas, konsentrasi plasma, P_T,yang mungkin berubah selama kondisi sakit dan dengan konsentrasi obat dalam tubuh. Harga n dan K_a memberikan estimasi umum dari affinitas dan kapasitas pengikatan dari obat, karena plasma mengandung campuran kompleks protein. Pengikatan obat-protein dalam plasma, mungkin dipengaruhi oleh kompetisi bahan, seperti ion, asam lemak bebas, metabolit obat, dan obat yang lain. Penentuan pengikatan obat-protein dapat diperoleh dalam interval konsentrasi obat yang luas, sebab pada konsentrasi rendah dari obat, tempat pengikatan yang mempunyai affinitas tinggi, kapasitas yang rendah mungkin tidak akan terjadi atau pada konsentrasi obat yang tinggi, penjenuhan dari tempat pengikatan protein mungkin terjadi.

I.5. Hubungan antara konsentrasi protein dan konsentrasi obat pada pengikatan obat-protein.

Konsentrasi obat, konsentrasi protein, dan tetapan assosisasi (affinitas) K_a, mempengaruhi fraksi pengikatan obat (persamaan 9). Pada konsentrasi protein yang tetap (merupakan kasus yang normal), fraksi dari obat yang berikatan akan *menurun* dengan *menaiknya* konsentrasi obat (gambar 7).



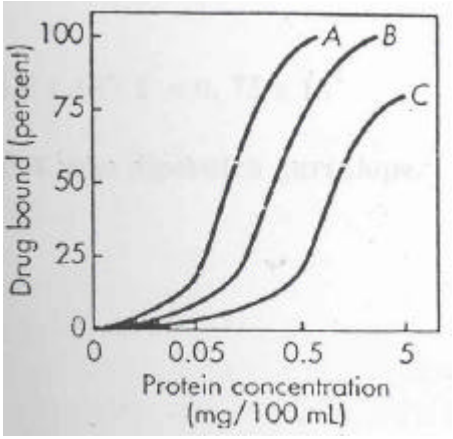
Gambar 7. Fraksi obat terikat *versus* konsentrasi obat pada konsentrasi protein yang tetap.

Pada konsentrasi protein yang tetap, hanya beberapa dari jumlah tempat pengikatan yang tersedia untuk obat. Pada konsentrasi obat yang rendah, umumnya obat mungkin berikatan dengan protein, namun, pada konsentrasi obat yang tinggi, tempat pengikatan protein mungkin menjadi jenuh, yang mengakibatkan kenaikan yang cepat dari konsentrasi obat bebas. Untuk memperlihatkan hubungan konsentrasi obat, konsentrasi protein, dan K_a, rumus berikut diperoleh dari persamaan 9 dan 10.

$$ß = \frac{1}{1 + \frac{(D)}{n P_T} + \frac{1}{n K_a P_T}} \qquad \text{..... 12)}$$

Dari persamaan 12, baik konsentrasi obat bebas, (D), dan konsentrasi total protein, P_T,akan mempunyai efek yang penting pada fraksi obat yang terikat. Beberapa faktor yang tiba tiba menaikkan konsentrasi fraksi obat bebas dalam plasma akan menyebabkan perubahan pharmakokinetik dari obat. Pada umumnya, sebab pengikatan protein adalah nonlinear, persen obat yang terikat tergantung baik pada konsentrasi obat dan protein dalam plasma. Dalam kondisi sakit, konsentrasi protein dapat berubah ubah, sehingga berakibat terhadap persen obat yang terikat. Efek dari persen protein diperlihatkan dalam gambar 8. Bila konsentrasi protein meningkat, persen obat yang berikatan meningkat sampai maksimum. Bentuk dari kurva ditentukan oleh tetapan assosiasi kompleks protein- obat dan konsentrasi obat.

©2003 Digitized by USU digital library



Gambar 8. Efek konsentrasi protein pada persentase pengikatan obat. A, B, dan C, memperlihatkan obat hipotetis dengan penurunan affinitas pengikatan.

SOAL :

Tentukanlah jumlah dari tempat pengikatan (*n*) dan tetapan dissosiasi (K_a) dari data berikut dengan mempergunakan persamaan scatchard.

r	(D x 10^{-4} M)	r/ (D)
0,40	0,33	
0,80	0,89	
1,20	2,00	
1,60	5,33	

Dapatkah *n* dan K_a mempunyai nilai fraksional ? Mengapa ?

Jawab :
Hitung *r*/(D) versus *r*, maka dihasilkan grafik dengan koordinat yang rectangular (spt empat persegi panjang)

r	*r*/ (D x 10^{4} M)
0,40	1,21
0,80	0,90
1,20	0,60
1,60	0,30

y- intersep = nK_a = 1,5 x 10^4

x- intersep = *n* = 2.

Sehingga,
K_a = 1,5 x 10^4 / 2 = 0, 75 x 10^4

Harga K_a dapat juga diperoleh dari slope.

©2003 Digitized by USU digital library

I. 6. Kesetimbangan massa obat dan volume distribusi yang diamati. (Mass Balance of Drug and Apparent Volume Distribution)

Volume distribusi hasil pengamatan, V_D, digunakan untuk meramalkan adanya distribusi obat kedalam badan. Meskipun volume distribusi hasil pengamatan tidak menggambarkan ukuran secara fisika dari jaringan, V_D menggambarkan hasil dari distribusi dinamik obat antara jaringan dan darah. Sebagai ilustrasi untuk pemakaian V_D, dilakukan contoh degan melarutkan obat dalam larutan yang sederhana. Istilah volume dibutuhkan untuk menjelaskan hubungan konsentrasi obat yang terdapat dalam sistem (atau tubuh manusia) terhadap jumlah obat yang ditambahkan kedalam sistem. Volume daripada sistem mungkin dapat diramalkan bila jumlah obat yang ditambahkan kedalam sistem dan konsentrasi obat setelah setimbang didalam sistem diketahui.

$$\text{Volume (L)} = \frac{\text{Jumlah (mg) obat yg ditambahkan kedlm sistem}}{\text{Kons. Obat (mg/L) dlm sistem setelah setimbang}} \quad ..13)$$

Persamaan diatas menggambarkan hubungan konsentrasi, volume, dan massa, seperti yang terlihat dalam persamaan berikut :

Konsentrasi (mg/ L) x volume (L) = Massa (mg) ....14)

Pertimbangan dalam menghitung volume distribusi.

<u>Contoh simulasi.</u>

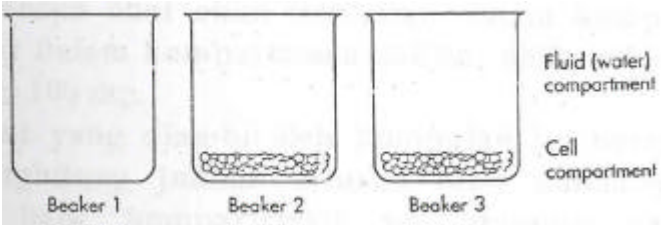
Dianggap bahwa ada 3 (tiga) gelas kimia (beaker glass) masing masing diisi dengan 100 ml air. Kemudian 100 mg obat ditambahkan kedalam masing masing gelas kimia (gbr. 9). Beaker 1 mengandung hanya air; beaker 2 dan 3 masing masing mengandung air dan kompartemen kecil yang mengandung kultur sel. Sel dalam beaker 2 dapat mengikat obat sedangkan sel dalam beaker 3 dapat memetabolisme obat. Seratus mg obat ditambahkan kepada setiap beaker, dan konsentrasi dari obat dalam kompartemen air (cairan) disampling dan ditentukan kadarnya. Sesudah sejumlah obat ditambahkan dan konsentrasi obat cairan dalam setiap beaker berada dalam kesetimbangan, volume air mungkin dihitung. Tujuan dari latihan ini adalah untuk menentukan bagaimana cara menghitung volume dalam setiap kasus dan membandingkan volume yang dihitung dengan volume air sebenarnya dalam beaker.

Gelas kimia (beaker) I : Distribusi obat hanya dalam kompartemen Cairan (air) tanpa pengikatan obat dan metabolisme.

Gelas kimia (beaker) II : Distribusi obat dalam kompartemen cairan mengandung kumpulan sel yang mengikat obat secara bolak balik.

Gelas kimia(beaker) III : Distribusi obat dalam kompartemen cairan mengandung kumpulan sel (sama seperti pada jaringan *in vivo*) dimana obat mungkin dimetabolisme dan hasil metabolisme berikatan pada sel.

©2003 Digitized by USU digital library



Gambar 9 , Percobaan meniru distribusi obat dalam badan.
Gelas kimia 3 (tiga) buah, masing - masing mengandung 100 ml air (kompartemen cairan) dan 100 mg obat yang larut dalam air. Gelas kimia 2 dan 3 juga mengandung 5 ml kumpulan sel kultur.

Kasus pertama .

Volume air pada beaker I dihitung dari jumlah obat yang ditambahkan (100 mg) dan kesetimbangan konsentrasi obat mempergunakan persamaan 13, setelah kesetimbangan, konsentrasi obat dihitung sebesar 1mg / ml.

Volume = 100 mg / 1 mg / ml = 100 ml.

Perhitungan volume pada beaker I menegaskan bahwa, sistem sederhana dan homogen, dalam hal ini, memperlihatkan volume cairan sebenarnya dari beaker.

Kasus kedua.

Gelas kimia ke 2 mengandung kumpulan sel yang menempel pada dasar gelas kimia. Pengikatan obat pada protein dari sel ditemukan di permukaan dan didalam interior cytoplasma. Keadaan ini memperlihatkan sistem heterogen yang terdiri dari kompartemen cairan yang berputar sempurna (well- strirred fluid compartment) dan jaringan (sel). Untuk menetukan volume dari sistem ini secara teliti, dibutuhkan informasi yang lebih banyak daripada kasus pertama.

1. Jumlah obat yang dilarutkan kedalam kompartemen cairan harus ditentukan. Sebab beberapa obat akan berikatan dalam kompartemen sel, jumlah obat dalam kompartemen cairan pada gelas kimia akan kurang dari 100 mg.
2. Jumlah obat yang diambil oleh kumpulan sel, harus diketahui untuk menghitung jumlah seluruh obat dalam gelas kimia. Sehingga, baik kompartemen sel ataupun cairan harus disampling dan diperiksa kadarnya untuk menentukan konsentrasi obat dalam setiap kompartemen.
3. Volume dari kumpulan sel harus ditentukan.

Dianggap bahwa telah dilakukan pemeriksaan seperti diatas dan diperoleh informasi sebagai berikut :

- Konsentrasi obat dalam kompartemen cairan = 0,5 mg / ml.
- Konsentrasi obat dalam kumpulan sel = 10 mg / ml.
- Volume kumpulan sel = 5 ml.
- Jumlah obat yang ditambahkan = 100 mg.
- Jumlah obat yang bergabung dengan sel
  = 10 mg / ml x 5 ml = 50 mg.
- Jumlah obat yang terlarut dalam kompartemen cairan (air)
  = 100 mg (total) – 50 mg (dalam sel) = 50 mg (dalam air).

©2003 Digitized by USU digital library

Mempergunakan informasi diatas, volume sebenarnya dari kompartemen cairan (air) dihitung dengan persamaan 13.

Volume yang diamati = 100 mg / 0,5 mg / ml = 100 ml.

Nilai 100 ml sesuai dengan volume cairan yang dimasukkan kedalam gelas kimia. Bila sel jaringan tidak dapat disampling, seperti dalam kasus pemberian obat *in vivo*, volume kompartemen cairan (air) dihitung memakai persamaan 13, dianggap sistem homogen.

Volume yang diamati = 100 mg / 0,5 mg / ml = 200 ml.

Nilai 200 ml adalah secara nyata lebih besar dari dugaan (over estimasi) volume sebenarnya (100 ml) dari sistem. Bila merupakan sistem heterogen, volume sebenarnya atau yang nyata dari sistem, dapat ditentukan dengan tidak teliti, dengan mengamati hanya satu kompartemen. Sehingga volume distribusi yang diamati dihitung dan infra struktur dari sistem diabaikan. Istilah *volume distribusi yang diamati* (apparent volume of distribution) menunjukkan ketiadaan karakteristik volume distribusi sebenarnya. Volume distribusi yang diamati digunakan dalam pharmakokinetika sebab kompartemen jaringan (selluler) tidak mudah untuk disampling dan volume sebenarnya tidak diketahui. Bila percobaan pada gelas kimia ke 2, dilakukan dengan volume yang sama dari sel kultur yang mempunyai afinitas pengikatan untuk obat yang berbeda, maka volume distribusi yang diamati sangat dipengaruhi oleh adanya pengikatan obat pada sel (tabel. 5).

Tabel 5. Relationship of Volume of Distribution and Amount of Drug in Tissue (Cellular) Compartment[a]

TOTAL DRUG (mg)	VOLUME OF CELLS (mL)	DRUG IN CELLS (mg)	DRUG IN WATER (mg)	DRUG CONCENTRATION IN WATER (mg/mL)	V_D IN WATER (mL)
100	15	75	25	0.25	400
100	10	50	50	0.50	200
100	5	25	75	0.75	133
100	1	5	95	0.95	105

[a]For each condition, the true water (fluid) compartment is 100 mL. Apparent volume of distribution (V_D) is calculated according to Equation 11.5.

Seperti terlihat pada tabel 5, bila jumlah obat dalam kompartemen sel meningkat (kolom 3), V_D yang diamati dari kompartemen cairan meningkat (kolom 6). Pengikatan obat pada sel secara keseluruhan, efektip menarik molekul obat keluar dari kompartemen cairan, menurunkan konsentrasi obat dalam kompartemen cairan, dan meningkatkan V_D. Dalam system biologi, kuantitas sel, volume kompartemen sel, dan adanya pengikatan obat dalam sel akan mempengaruhi V_D. Volume sel yang besar dan / atau pengikatan obat yang luas dalam sel, mengurangi konsentrasi obat dalam kompartemen cairan dan meningkatkan volume distribusi yang diamati. Dalam contoh ini, kompartemen cairan sebanding dengan kompartemen pusat dan kompartemen sel analog dengan kompartemen jaringan atau pinggir. Bila obat didistribusikan secara luas kedalam jaringan atau kedalam jaringan dengan kepekatan yang tidak sama rata, V_D untuk obat dapat melebihi volume secara fisika dari tubuh (lebih kurang 70 L total volume atau 42 L air tubuh untuk subjek 70 kg). Disamping pengikatan protein secara sellular, partisi dari obat kedalam kompartemen sellular lipid dapat menurunkan V_D secara kuat. Banyak obat mempunyai koefisien air / minyak diatas 10,000, obat lipofilik ini hampir seluruhnya terdapat pada fase lipid dari jaringan adipose, menghasilkan konsentrasi obat yang sangat rendah pada air ekstrasellular. Umumnya obat dengan nilai V_D yang sangat

besar, akan mempunyai konsentrasi obat yang sangat rendah dalam plasma. V_D yang besar selalu diinterpretasikan sebagai distribusi yang luas dari obat tersebut, meskipun banyak faktor lain juga berpengaruh pada perhitungan peninggian volume distribusi yang diamati. V_D sebenarnya yang melebihi volume dari tubuh tidak mungkin secara fisika. Hanya bila konsentrasi obat, baik pada kompartemen jaringan dan plasma diteliti dan volume setiap kompartemen secara nyata ditetapkan, maka volume sebenarnya secara fisika dapat ditentukan.

Kasus ketiga.

Obat dalam kompartemen sel pada beaker 3 menurun, metabolisme tidaak akan terditeksi, sebab hasil metabolisme yang terbentuk akan berikatan dengan sel periferal. Sehingga, volume distribusi yang diamati juga akan lebih besar dari 100 ml. Berbagai penyebab yang tidak diketahui, yang menurunkan konsentrasi obat dalam kompartemen cairan akan meningkatkan V_D, dihasilkan dalam over estimasi dari volume distribusi yang diamati. Hal ini dapat digambarkan dengan percobaan dalam gelas kimia 3. Dalam gelas kimia 3, kumpulan sel akan memetabolisme obat dan mengikat hasil metabolisme pada sel. Sehingga, obat secara efektif akan dikeluarkan dari konsentrasi cairan. Data untuk percobaan ini (*catatan*, bahwa hasil metabolisme dinyatakan sama dengan obat utuh) adalah sbb:

- Jumlah obat yang terdapat dalam gelas kimia = 100 mg.
- Kompartemen sel
  - Konsentrasi obat = 0,2 mg / ml.
  - Konsentrasi hasil metabolisme yg berikatan = 9,71 mg / ml.
  - Konsentrasi hasil metabolisme yg bebas = 0, 29 mg / ml.
  - Volume sel = 5 ml.
- Kompartemen cairan (air)
  - Konsentrasi obat = 0, 2 mg / ml
  - Konsentrasi hasil metabolisme = 0, 29 mg / ml.

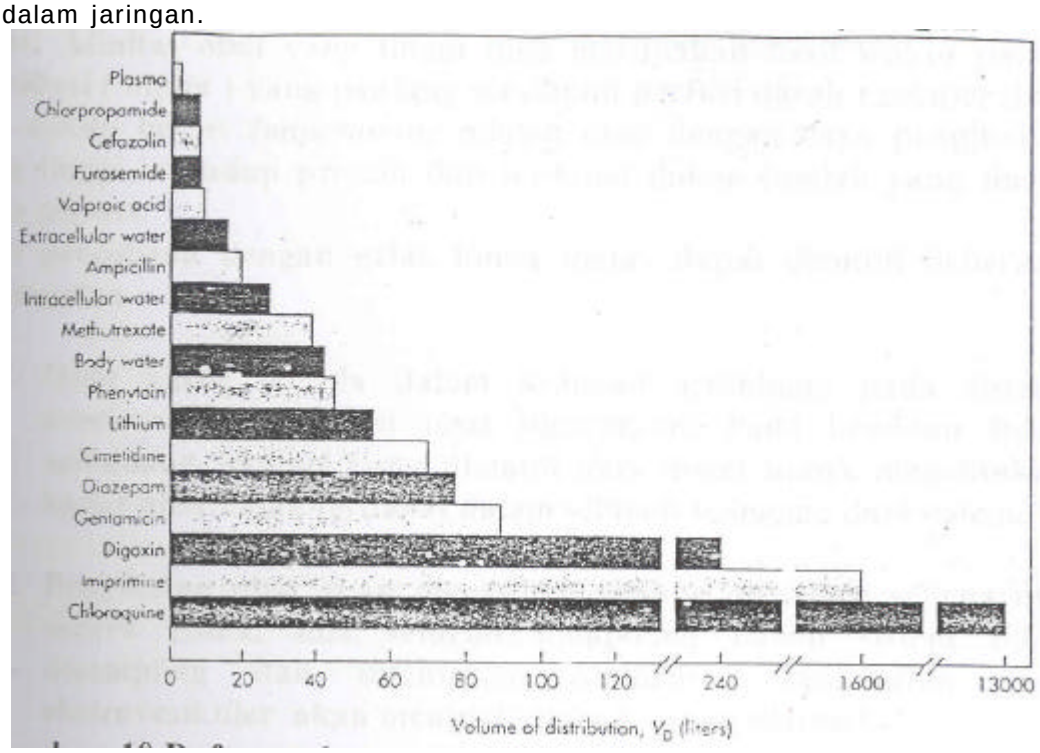
Untuk menghitung jumlah total obat dan hasil metabolisme dalam kompartemen sel, persamaan diatur sebagai berikut :
Total obat dan hasil metabolisme dalam sel
= 5 ml x (0,2 + 9,71 + 0, 29 mg / ml) = 51 mg.
Sehingga total obat dalam kompartemen cairan adalah :
(100 – 51) mg = 49 mg.
Bila hanya obat utuh yang diketahui, V_D dapat dihitung dengan persamaan 13,

$$V_D = 100 \text{ mg} / 0{,}2 \text{ mg / ml} = 500 \text{ ml.}$$

Mengingat bahwa hanya 100 ml air yang terdapat dalam gelas kimia 3, perhitungan bahwa volume distribusi yang diamati 500 ml, merupakan *over estimasi* dari volume cairan sebenarnya pada sistem. Distribusi obat dalam sistem biologi digambarkan seperti, gambar : 11.
Dalam kumpulan plasma, terdapat albumin lebih kurang 4,4 g / dL. Konsentrasi albumin lebih rendah dalam cairan ekstraselluler, lebih kurang 60 % dari level plasma. Hanya obat bebas akan terdifusi antara plasma dan cairan jaringan. Sebaliknya, cairan jaringan, setimbang dengan air intraselluler dalam sel jaringan. Konsentrasi obat dalam jaringan dipengaruhi oleh koefisien partisi (afinitas lemak / air) dari obat dan pengikatan obat dengan protein jaringan.
Gambar, 10. merupakan daftar dari volume distribusi pada keadaan tunak dari 10 obat yang umum yang disusun secara tegak dengan berturutan. Obat dengan

©2003 Digitized by USU digital library

distribusi yang lebih rendah dalam air ekstraselluler akan lebih banyak terdistribusi kedalam jaringan.



Gambar, 10.Daftar volume distribusi dalam keadaan tunak dari 10 obat yang umum, disusun secara tegak, memperlihatkan berbagai faktor yang mempengaruhi V_D. Obat dengan V_D yang tinggi, umumnya mempunyai afinitas jaringan yang tinggi atau pengikatan yang rendah terhadap serum albumin. Obat polar atau hidrofilik cendrung mempunyai V_D yang sama dengan volume air ekstraselluler.

Sebagai perbandingan volume yang ideal secara physiologis untuk manusia dengan berat 70 kg telah disusun sebagai berikut :
(1) plasma (3 L), (2) cairan ekstraselluler (15 L), dan (3) cairan intraselluler (27 L). Obat seperti penicillin, cephalosporin, asam valproat, dan furosemide adalah senyawa polar yang umumnya terdapat dalam plasma dan cairan ekstraselluler. Beberapa level obat dalam jaringan yang tidak umum, biasanya dipengaruhi oleh pengikatan protein atau adanya pembawa khusus atau sistem effluks. Bila volume distribusi sangat tinggi (> dari volume tubuh yaitu 70 L) yang umumnya berhubungan dengan penyimpanan khusus pada jaringan yang akan memindahkan obat dari cairan plasma. Sebagai contoh : *Digoxin*, akan berikatan dengan membran myocardial, yang mempunyai level obat 60 dan 130 kali level obat dalam serum, pada anak anak dan dewasa (*Park, dkk 1982*). Tingginya pengikatan jaringan merupakan akibat dari volume distribusi masa tunak yang besar. Afinitas obat yang tinggi juga merupakan hasil waktu paruh distribusi (alpha) yang panjang meskipun perfusi darah vaskuler dari hati cukup besar. *Imiperamine* adalah obat dengan daya pengikatan yang tinggi terhadap protein dan terdapat dalam jumlah yang tinggi pada plasma.

Dari percobaan dengan gelas kimia diatas dapat diambil beberapa kesimpulan :

1. Obat harus berada dalam keadaan setimbang pada sistem, sebelum konsentrasi obat ditentukan. Pada keadaan tidak setimbang, sampel yang diambil dari sistim untuk menentukan kadar obat, tidak terdapat dalam seluruh bahagian dari sistem.

2. Pengikatan obat akan mengubah volume distribusi sebenarnya secara fisika, bila seluruh komponen dalam sistem tidak disampling dan ditentukan kadarnya. Pengikatan obat ekstravesikuler akan meningkatkan V_D yang diamati.

3. Baik pengikatan obat intravesikur atau ekstravesikuer harus dilakukan, untuk menentukan volume distribusi.

4. V_D yang diamati penting untuk menentukan distribusi relatip obat diluar konsentrasi plasma. Bertambah besar pengikatan obat dengan jaringan dan penimbunan obat, akan meninggikan V_D, namun bertambah besar pengikatan obat dengan protein plasma maak distribusi V_D akan menurun.

5. Metabolisme obat yang tidak terdeteksi, akan meningkatkan V_D.

6. V_D yang diamati lebih besar daripada gabungan volume plasma dan air tubuh, menunjukkan proses (4) dan (5) atau keduanya.

7. Meskipun V_D tidak merupakan volume fisiologis yang sebenarnya, V_D sangat berguna untuk menghubungkan konsentrasi obat dalam plasma dengan jumlah obat dalam tubuh (persamaan 13). Hubungan dari hasil konsentrasi obat dan volume sama dengan total massa obat, sangat penting dalam pharmakokinetik.

Soal

Tabel 5 , memperlihatkan jumlah obat dalam sistem, dihitung dari V_D dan konsentrasi obat dalam kompartemen cairan. Hitunglah jumlah obat dalam sistem mempergunakan volume sebenarnya dan konsentrasi obat dalam kompartemen cairan.

Penyelesaian .

Dalam setiap keadaan, hasil dari konsentrasi obat (kolom 5) kali_volume distribusi yang diamati (kolom 6) menghasilkan 100 mg obat; perhitungan yang teliti untuk jumlah total obat yang terdapat dalam sistem. Sebagai contoh : 0, 25 mg / ml x 400 ml = 100 mg. Harus diingat bahwa jumlah obat yang ada tidak dapat ditentukan dengan menggunakan volume sebenarnya dan konsentrasi obat (kolom 5). Pendekatan secara physiologis memerlukan lebih banyak informasi meliputi :

(1). Konsentrasi obat dalam sel.
(2). Volume dari kompartemen sel.
(3). Volume kompartemen cairan.

Jumlah total obat adalah sama dengan jumlah obat dalam kompartemen sel dan jumlah obat dalam kompartemen cairan.

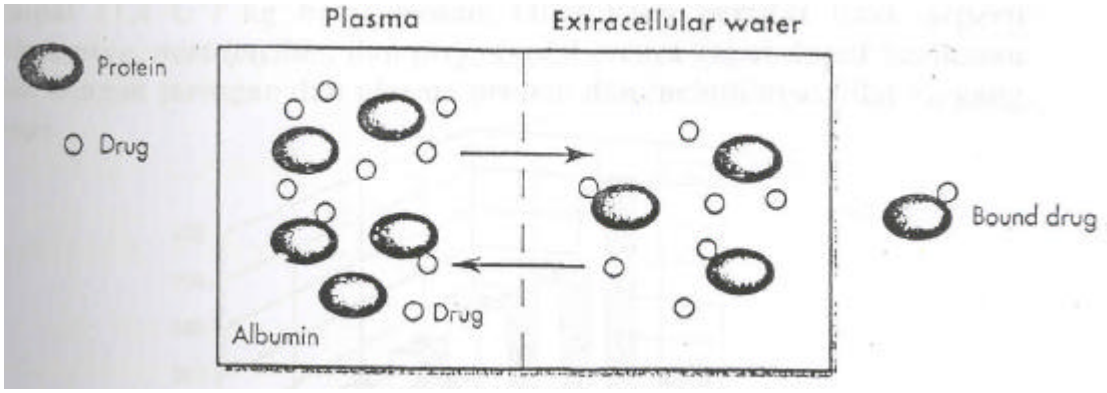
©2003 Digitized by USU digital library

(15 mg / ml x 5 ml) + (100 ml x 0,25 mg / ml) = 100 mg.

Kedua pendekatan diatas memperlihatkan perhitungan yang benar untuk setiap jumlah obat yang terdapat dalam sistem. Meskipun, pendekatan kedua membutuhkan informasi yang lebih dari yang biasa dilakukan. Pendekatan untuk yang kedua, demikian juga, namun, lebih mengarah pada physiologi. Umumnya lingkungan fisiologis kompartemen, tidak dapat menentukan secara jelas konsentrasi obat.

7. Efek dari pengikatan protein pada volume distribusi yang diamati.

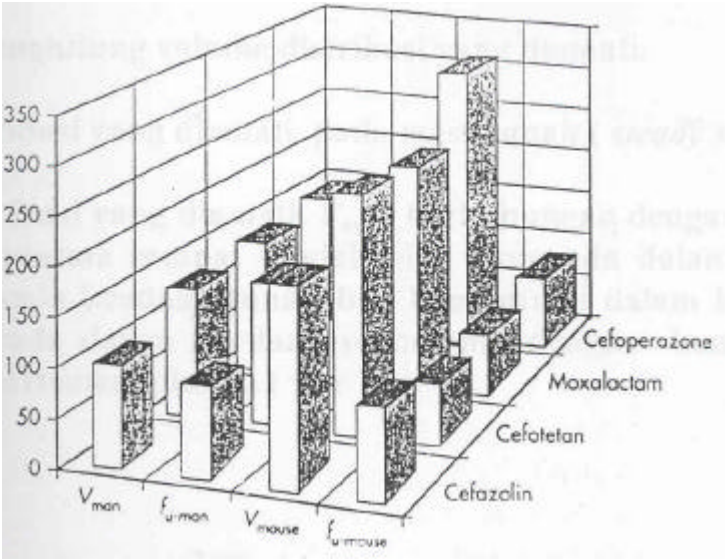
Adanya ikatan protein-obat pada plasma atau jaringan akan mempunyai efek terhadap V_D . Obat yang berikatan dengan kuat pada plasma protein, akan mempunyai fraksi obat bebas yang rendah (f_u = fraksi obat yang bebas) pada air plasma, sukar terdifusi, dan kurang cepat terdistribusi pada jaringan (gbr. 11).



Gambar 11. Diagram yang memperlihatkan obat yang berikatan tidak Akan terdifusi melalui membrane tetapi obat bebas akan terdifusi bebas antara plasma dan air ekstrasellular.

Obat dengan pengikatan terhadap protein yang rendah mempunyai f_u yang besar dan secara umum mudah terdifusi dan volume distribusi besar. Sebab volume distribusi hasil pengamatan dipengaruhi oleh kelarutan dalam lemak disamping pengikatan protein, ada beberapa pengecualian terhadap aturan. Namun, bila beberapa obat dipilih dari satu golongan dengan karakteristik fisika dan partisi terhadap lemak yang berdekatan, volume distribusi hasil pengamatan mungkin dapat dijelaskan dengan tingkatan relatip pengikatan obat terhadap jaringan dan protein plasma. Nilai V_D dari 4 (empat) antibiotik cephalosporine (gbr. 12) pada manusia dan hewan (*Sawada dkk 1984*) memperlihatkan bahwa perbedaan volume distribusi dari *cefazolin, cefotetan, moxalactam*, dan *cefoperazone* adalah berkaitan erat dengan perbedaan derajat pengikatan protein. Sebagai contoh, fraksi obat yang tidak terikat f_u dalam plasma manusia dan tikus yang tertinggi adalah *cefoperazone,* dan volume distribusi baik pada manusia atau tikus juga merupakan yang tertinggi diantara ke 4 (empat) obat tersebut. Sebaliknya, *cefazolin* mempunyai f_u yang terendah pada manusia dan diikuti dengan volume distribusi yang terendah. Sangat penting, bahwa volume distribusi *per* kg pada manusia ($V_{manusia}$) umumnya lebih besar daripada tikus (V_{tikus}) sebab fraksi obat bebas juga lebih tinggi, menghasilkan volume distribusi yang lebih besar. Perbedaan dalam nilai V_D dan $t_{1/2}$ diantara jenis yang berbeda mungkin karena perbedaan dalam pengikatan protein. Obat, seperti *furosemide*, *sulfisoxazole*, *tolbutamide*, dan *warfarin* dapat berikatan

lebih besar dari 90% dengan protein plasma dan mempunyai rentang nilai V_D dari 7,7 sampai 11,2 L / kg berat badan. Obat yang bersifat basa, seperti *imipramine*, *nortriptyline*, dan *propranolo*l secara cepat dapat berikatan baik dengan jaringan dan plasma protein dan mempunyai nilai V_D yang besar.



Gambar 12. Plot dari V_D 4 (empat) antibiotik cephalosporine pada Manusia dan tikus memperlihatkan hubungan antara Fraksi obat tidak terikat (f_u) dan volume distribusi (*Sawada dkk 1984*)

Seperti telah dibicarakan terdahulu, perpindahan obat dari protein plasma dapat mempengaruhi pharmakokinetik obat dengan berbagai cara :

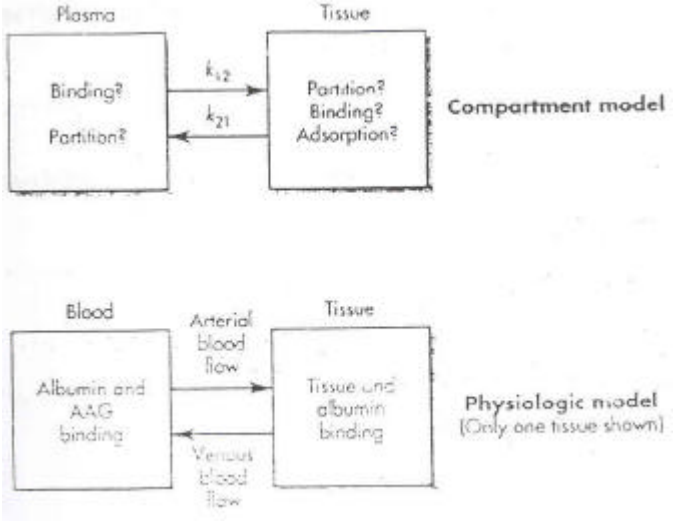
1. Secara langsung meningkatkan konsentrasi obat bebas (tidak terikat) sebagai hasil pengurangan pengikatan dalam darah.
2. Meningkatkan konsentrasi obat bebas yang akan mencapai secara langsung tempat reseptor, yang menyebabkan respon pharmakodimamik (atau toksik) akan lebih kuat .
3. Peningkatan konsentrasi obat bebas menyebabkan peningkatan sementara V_D dan penurunan sebahagian dari peningkatan konsentrasi obat bebas dalam plasma.
4. Peningkatan konsentrasi obat bebas menghasilkan lebih banyak obat terdifusi kedalam jaringan dari eliminasi organ, terutama hati dan ginjal, yang menghasilkan peningkatan sementara dari eliminasi obat. Konsentrasi obat terakhir yang mencapai target (sasaran) tergantung pada satu atau lebih dari keempat faktor yang berperanan pada keadaan klinis. Sebelum perubahan dosis dilakukan maka efek dari pengikatan protein harus dievaluasi secara hati hati.

I. 8. Cara menghitung volume distribusi yang diamati.

Volume distribusi yang diamati pada masa tunak (*steady state*).

Volume distribusi yang diamati, V_{app} , berhubungan dengan konsentrasi obat dalam plasma sampai jumlah obat yang ada dalam tubuh. V_{app} ditentukan pada keadaan

tunak bila konsentrasi dalam kompartemen jaringan berada dalam keadaan setimbang dengan konsentrasi obat dalam kompartemen plasma (gbr 13).



Gambar 13, Diagram memperlihatkan. *Atas*, Distribusi obat dengan pendekatan model 2 kompartemen. *Bawah*, Distribusi obat dengan pendekatan physiologis.

Berdasarkan persamaan 13 diatas, maka :

$V_{app} = D_B / C_P$ ..... 15).

$D_B = V_P C_P + V_t C_t$ .....16).

Dimana :

D_B : Jumlah obat dalam tubuh.
V_P : Volume kompartemen plasma.
V_t : Volume kompartemen jaringan.
C_P : Konsentrasi obat dalam plasma.
C_t : Konsentrasi obat dalam jaringan.

Sebab obat dapat berikatan baik terhadap protein plasma maupun jaringan, maka konsentrasi obat bebas maupun terikat harus diperhatikan. Dalam keadaan tunak (steady state), obat bebas pada plasma dan jaringan berada dalam keadaan setimbang.

$C_u = C_{ut}$ ..... 17)

Sehingga, kemungkinan lain :

$C_p f_u = C_t f_{ut}$ ..... 18)

atau

$C_t = C_p f_u / f_{ut}$ .....19)

Dimana :

f_u : fraksi obat bebas pada plasma.
f_{ut} : fraksi obat bebas pada jaringan.
C_u : konsentrasi obat bebas pada plasma.
C_{ut} : konsentrasi obat bebas pada jaringan.

Subsitusikan persamaan 19) kedalam persamaan 16) maka diperoleh :

$$D_B = V_p C_p + V_t [C_p (f_u / f_{ut})] \quad .....20)$$

Bila dilakukan penataan kembali, maka :

$$D_B / C_p = V_p + V_t [f_u / f_{ut}] \quad ..... 21)$$

Sebab,
$D_B / C_p = V_{app}$ (persamaan 15), dengan mensubsitusi kepada persamaan 21, maka V_{app} dapat diestimasi dari persamaan 22).

$$V_{app} = V_p + V_t [f_u / f_{ut}] \quad .....22)$$

Persamaan 22) merupakan hubungan jumlah obat dalam tubuh dengan volume plasma, volume jaringan, dan fraksi obat bebas dalam plasma dan jaringan. Persamaan 22) juga dapat diperluas meliputi beberapa jaringan organ dengan masing masing V_{ti} dan fraksi obat bebas dalam jaringan f_{uti}.

$$V_{app} = V_p + S V_{ti} [f_u / f_{uti}] \quad .....23)$$

Dimana,

V_{ti} : volume jaringan dari organ yang ke i^{th}.
f_{uti} : fraksi bebas dari organ yang ke i^{th}.

Beberapa pertimbangan yang penting untuk menghitung V_{app}.

1. Volume distribusi hanya tetap, bila konsentrasi obat dalam plasma dan jaringan berada dalam keadaan setimbang .
2. Nilai dari = f_u dan = f_{ut} tergantung pada konsentrasi dan harus ditentukan pada kondisi kesetimbangan.
3. Persamaan 23) memperlihatkan bahwa V_{app} secara tidak langsung menentukan pengikatan obat dalam jaringan bukan menentukan volume sebenarnya secara anatomi.
4. Bila = f_u dan = f_{ut} adalah sama, persamaan 23) menjadi lebih sederhana yaitu :

$$D_B / C_p = V_p + V_t \quad ..... 24).$$

Bila tidak ditemukan adanya pengikatan obat dalam jaringan dan plasma, volume distribusi tidak akan melebihi volume sebenarnya secara anatomi. Hanya dalam keadaan setimbang, konsentrasi obat bebas $C_p = C_t$. Pada waktu yang lain, C_p tidak sama dengan C_t. Nilai dari D_B tidak dapat dengan mudah dihitung dari V_{app} dan C_p pada kondisi tidak setimbang.

©2003 Digitized by USU digital library

Soal .
Obat A dan B masing masing dengan V_{app} = 20 L dan 100 L, kedua obat mempunyai V_p = 4 L dan V_t = 10 L, dan kedua obat berikatan dengan protein plasma sebesar 60 %. Apakah fraksi pengikatan dari jaringan terhadap kedua obat ? Dianggap V_p = 4 L dan V_t = 10 L.

Pemecahan masalah .

Obat A.

Pergunakan persamaan 22)

$$V_{app} = V_p + V_t \, [f_u / f_{ut}]$$

Sebab obat A 60 % terikat , maka obat 40 % bebas, atau f_u = 0,4.

$$20 = 4 + 10 (0,4 / f_{ut})$$

$$f_{ut} = 4 / 16 = 0, 25.$$

Fraksi obat yang terikat pada jaringan adalah 1–0, 25 = 0,75 atau 75 %.

Obat B.

$$100 = 4 + 10 (0,4 / f_{ut})$$

$$f_{ut} = 0,042$$

Fraksi obat yang terikat pada jaringan adalah 1-0,042 = 0,958 = 95,8 %.

Persen obat bebas dalam cairan plasma untuk obat A adalah 25 % dan untuk obat B adalah 4,2 %. Obat B lebih kuat berikatan dengan jaringan, yang menyebabkan volume distribusi yang diamati lebih besar. Pendekatan ini menganggap bahwa kumpulan jaringan dalam keadaan utuh, sebab tidak mungkin mengidentifikasi kumpulan jaringan secara fisika pada mana obat berikatan. Persamaan 22) dapat menjelaskan variasi yang luas dari volume distribusi yang diamati untuk obat yang diteliti dalam literatur (tabel 6 sampai tabel 8). Obat dalam tabel 6, mempunyai volume distribusi yang diamati kecil sebab pengikatan obat pada plasma (kurang dari 10 L bila diekstrapolasi terhadap berat 70 kg).

DRUG	PLASMA FRACTION BOUND (%)	AFFINITY CONSTANT (M^{-1})	V_D (L/kg)
Clofibric acid	97	300,000	0.09
Fluorophenindione	95	3,000,000	0.09
Phenylbutazone	99	230,000	0.09
Warfarin	97	230,000	0.13

From Houin (1985), with permission.

Tabel 6, Hubungan antara afinitas untuk serum albumin dan volume distribusi untuk beberapa obat bersifat asam.

Tabel 6, Hubungan antara afinitas untuk serum albumin dan volume distribusi untuk beberapa obat bersifat asam.

Obat pada tabel 7, memperlihatkan bahwa secara umum, bila fraksi obat yang bebas (tidak terikat), f_u, pada plasma meningkat, maka volume yang diamati meningkat. Pengurangan pengikatan obat dalam plasma menghasilkan peningkatan konsentrasi obat bebas yang berdifusi kedalam air ektraseluler. Kecuali untuk obat yang mempunyai volume distribusi yang besar, dapat mempunyai pengikatan terhadap jaringan yang tidak lazim. Beberapa obat bergerak kedalam cairan intertisial tetapi tidak dapat berdifusi melalui membran sel kedalam cairan intrasellular, sehingga mengurangi volume distribusi.

DRUG	PLASMA FRACTION UNBOUND (%)	V_D (L/kg)
Carbenoxolone	1	0.10
Ibuprofen	1	0.14
Phenylbutazone	1	0.10
Naproxen	2	0.09
Fusidic acid	3	0.15
Clofibrate	3	0.09
Warfarin	3	0.10
Bumetanide	4	0.18
Dicloxacillin	4	0.29
Furosemide	4	0.20
Tolbutamide	4	0.14
Nalidixic acid	5	0.35
Cloxacillin	5	0.34
Sulfaphenazole	5	0.29
Chlorpropramide	8	0.70
Oxacillin	8	0.44
Nafcillin	10	0.63

Tabel 7. Contoh obat, yang difusinya terbatas oleh pengikatan protein

Obat pada tabel 8, sebenarnya tidak memenuhi hukum pengikatan yang umum, sebab volume distribusinya tidak berhubungan dengan pengikatan obat pada plasma. Obat ini mempunyai volume distribusi yang amat besar dan mungkin tidak ditemukan pengikatan terhadap jaringan atau metabolisme jaringan. Berdasarkan pada aktifitas pharmakologinya, barangkali seluruh obat ini melakukan penetrasi kedalam lapisan intraselluler.

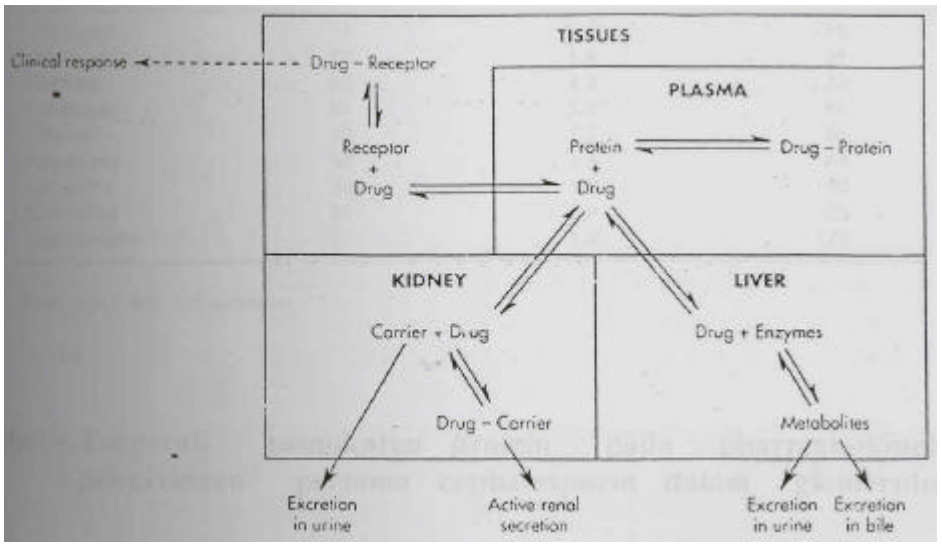
DRUG	PLASMA FRACTION BOUND (%)	V_D (L/kg)
Desipramine	92	40
Imipramine	95	30
Nortriptyline	94	39
Vinblastine	70	35
Vincristine	70	11

From Houin (1985), with permission.

Tabel 8. Contoh obat dimana distribusi jaringan tidak tergantung pengikatan protein plasma yang diamati.

I. 9. Hubungan antara pengikatan obat-plasma protein terhadap distribusi dan eliminasi.

Hubungan antara pengikatan obat-protein secara bolak balik pada plasma dan distribusi serta eliminasi obat, dilihat pada gambar 14.



Gambar 14. Efek pengikatan obat-protein secara bolak balik pada distribusi dan eliminasi obat.

Obat dapat berikatan dengan protein secara bolak balik. Obat bebas menembus membran sel menyebar keberbagai jaringan termasuk jaringan yang berperanan dalam eliminasi obat, seperti ginjal dan hati. Sekresi renal aktif, berupa sistem carrier mediated, mungkin mempunyai affinitas yang besar untuk molekul obat bebas dibandingkan terhadap plasma protein. Dalam kasus ini, ekskresi aktif melalui renal berlaku untuk ekskresi cepat obat meskipun obat berikatan dengan protein. Bila obat dipindahkan dari plasma protein, lebih banyak obat bebas yang dapat terdistribusi kedalam jaringan dan berinteraksi dengan reseptor yang berperanan untuk respon pharmakologi. Selanjutnya, lebih banyak obat bebas yang digunakan untuk eliminasi obat.

Penurunan dalam pengikatan protein akan menghasilkan konsentrasi obat bebas yang akan menyebabkan lebih banyak obat melalui membran sel dan terdistribusi kedalam seluruh jaringan. Sehingga akan lebih banyak obat yang dapat berinteraksi pada tempat reseptor untuk menghasilkan efek pharmakologi yang lebih kuat. Selanjutnya, banyak obat akan terdapat dalam jaringan yang akan terjadi eliminasi obat, termasuk hati dan ginjal. Waktu paruh eliminasi dari beberapa obat seperti cephalosporin, yang sebahagian besar diekskresi melalui renal ekskresi, umumnya meningkat bila persen pengikatan obat pada plasma meningkat (tabel 9).

	PROTEIN BOUND (%)	$t_{1/2}$ (hr)	RENAL CLEARANCE (mL/min/1.73 m^2)
Ceftriaxone	96	8.0	10
Cefoperazone	90	1.8	19
Cefotetan	85	3.3	28
Cefoxanide	81	3.0	44
Cefazolin	70	1.7	56
Moxalactam	52	2.3	64
Cefsulodin	26	1.5	90
Ceftazidime	22	1.9	85
Cephaloridine	21	1.5	125

From Houn (1985), with permission.

Tabel 9. Pengaruh pengikatan protein pada pharmakokinetik penyaringan pertama cephalosporin dalam glomerulus.

Ikatan obat-protein bekerja sebagai molekul yang besar yang tidak mudah berdifusi melalui membran kapiler pada *glomerulus.* Beberapa cephalosporin diekskresi melalui baik sekresi *renal* dan *biliary*. Waktu paruh dari obat yang secara signifikan dieksresi dalam empedu tidak berhubungan baik dengan adanya pengikatan plasma protein. Untuk obat yang sebahagian besar dimetabolisme oleh hati, pengikatan terhadap protein plasma mencegah obat memasuki *hepatocyte*, yang mengakibatkan pengurangan metabolisme oleh hati. Sebagai tambahan, ikatan molekuler obat tidak dapat digunakan sebagai substrat untuk enzim hati, dengan cara demikian , selanjutnya mengurangi kecepatan metabolisme. Secara umum, obat yang mempunyai pengikatan terhadap plasma protein yang tinggi dapat mengurangi seluruh bersihan obat. Bila beberapa obat dengan fraksi pengikatan plasma protein yang berbeda diteliti, kadang kadang tidak ada ditemukan pengurangan bersihan atau amat kecil sebab beberapa obat mempunyai sifat sebagai bersihan tidak terbatas (*nonrestricctively cleared*).

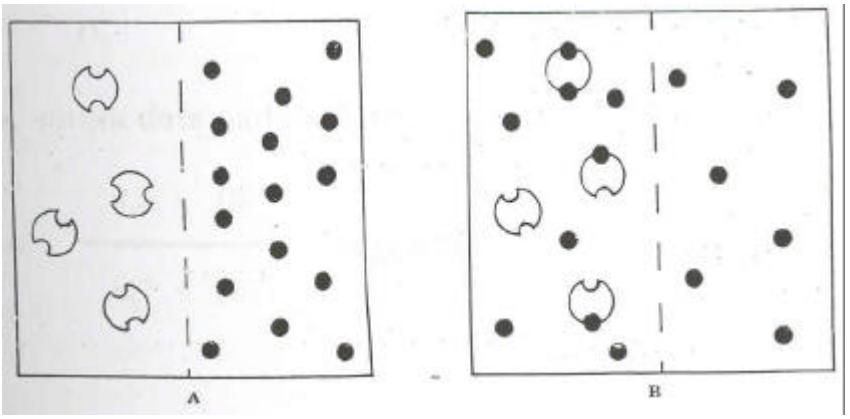
BAB II. METODE DAN HASIL PERCOBAAN.

II. 1. Metode.

Berbagai jenis metode percobaan dapat digunakan untuk penelitian terhadap pengikatan protein (*protein binding*). Sebahagian besar dari metode tersebut identik dengan yang digunakan untuk penelitian terhadap berbagai bentuk dari *kompleksasi*. Sebagai contoh, sifat kelarutan dari bentuk molekul yang kecil dengan ada / tanpa protein dapat diteliti untuk mengetahui derajat interaksi. Sama seperti, pengaruh protein terhadap sifat partisi dari molekul kecil antara fase berair dan pelarut organik yang tidak dapat bercampur, dapat diteliti. Dalam beberapa keadaan, pengikatan ditunjukkan oleh perubahan yang signifikan pada karakteristik spektra dari molekul kecil dan perubahan ini dapat digunakan untuk mengetahui derajat dimana pengikatan telah terjadi. Tehnik yang paling umum digunakan untuk menentukan kesetimbangan antara molekul kecil yang bebas dan yang terikat pada larutan protein adalah *kesetimbangan dialysis*. Disini, larutan protein dibatasi dengan membrane, misalnya *cellophane*, yang bersifat permiabel bebas terhadap bentuk molekul kecil tetapi tidak permiabel terhadap protein dan kompleks protein. Larutan protein, yang terdapat dalam membran, akan bersentuhan dengan larutan molekul kecil dan sistem dengan hati hati digoyang sampai kesetimbangan tercapai. Kemudian sampel dipisahkan dari larutan yang terdapat pada kedua sisi dari membran dan dianalisa untuk menentukan konsentrasi dari molekul yang terdapat dalam setiap larutan. Bila tidak terjadi pengikatan, kedua larutan akan mempunyai konsentrasi yang sama dari molekul kecil. Bila terjadi pengikatan, larutan yang mengandung protein akan mempunyai konsentrasi molekul kecil yang lebih tinggi, sebab akan ditemukan baik bentuk terikat ataupun bebas. Demikian pula, konsentrasi bentuk bebas akan menjadi sama dalam kedua larutan. Keadaan dapat digambarkan seperti, gambar 15. Tabel 10, memperlihatkan data yang diperoleh pada penelitian pengikatan kofeine oleh serum albumin dan digambarkan berupa pendekatan secara *kesetimbangan dialysis* untuk meneliti pengikatan protein. Tehnik yang lain yang banyak digunakan dan berkaitan dengan *kesetimbangan dialysis* adalah *ultrafiltrasi.* Disini, larutan yang mengandung protein dan molekul kecil disaring, dibawah tekanan, melalui membran yang tidak permiabel terhadap protein dan kompleks protein. Filtrat (hasil penyaringan) dalam volume yang relatip sedikit

©2003 Digitized by USU digital library

dikumpulkan dan dianalisa untuk mengetahui konsentrasi molekul kecil yang bebas, dan bahagian yang tidak tersaring (unfiltered) dianalisa untuk memperoleh konsentrasi total dari bentuk bebas dan terikat. Metode ini lebih cepat daripada metode kesetimbangan dialysis, tetapi mempunyai beberapa ketidaktentuan disebabkan perubahan konsentrasi protein selama *ultrafiltasi.*



Gambar 15. Percobaan kesetimbangan dialysis. Simbol terbuka yang besar menyatakan molekul protein: bulatan kecil yang berisi menyatakan molekul senyawa dengan berat molekul kecil yang mampu berikatan dengan protein.
A. Sebelum kesetimbangan, B. Sesudah kesetimbangan.

	Solution within membrane	Solution outside membrane
Volume	10 ml	10 ml
Concentration of albumin	2.8×10^{-4} *M*	0
Concentration of caffeine before equilibration	0	1×10^{-4} *M*
Concentration of caffeine after equilibration	0.7×10^{-4}	0.3×10^{-4}
Concentration of unbound caffeine is, therefore	0.3×10^{-4}	0.3×10^{-4}
Concentration of bound caffeine is, therefore	0.4×10^{-4}	0

$$r = \frac{0.4 \times 10^{-4}}{2.8 \times 10^{-4}} = 0.143$$

Tabel 10, Hasil yang diperoleh dari penelitian pengikatan kofeine oleh albumin yang berasal dari serum sapi.

II. 2. Hasil percobaan.

Banyak peneliti menuliskan hasil penelitian tentang pengikatan protein (binding protein) dalam bentuk fraksi total molekul kecil yang terdapat dalam bentuk terikat. Fraksi ini biasanya ditulis dalam bentuk symbol ß.

©2003 Digitized by USU digital library

$$ß = \frac{D_{ß}}{D_T}$$

Sebagai contoh, untuk data pada tabel 7,

$$ß = \frac{0,4 \times 10^{-4}}{0,7 \times 10^{-4}} = 0,571$$

Hal ini berarti, tentu, bahwa hanya 57,1 % dari kofeine pada kompartemen protein terdapat dalam bentuk kompleks protein.

II. 3. Signifikasi.

Informasi penting baik secara teoritis ataupun praktek telah diperoleh dari penelitian pengikatan protein. Sebagai contoh, penelitian dengan albumin telah menetapkan pengertian dari sifat alamiah sisa asam amino yang berperanan dalam proses pengikatan, karakteristik secara struktural yang meningkatkan pengikatan, dan kekuatan intermolekuler yang berperanan dalam pengikatan. Seluruh informasi ini cukup berarti, sebab ini dapat diekstrapolasi, untuk menghasilkan pengertian yang lebih baik, pada tingkatan molekuler, dari kerja obat dan aktifitas enzim. Secara praktek yang lebih berarti adalah bahwa pengikatan nonspesifik protein dalam tubuh dapat mempengaruhi sifat distribusi, pharmakologi dan pharmakokinetik obat. Kemungkinan ini mempunyai dasar secara logika yang terlihat dari ketidakmampuan protein dan kompleks protein menembus / melalui membran biologis. Maka, fraksi dosis obat yang berikatan dengan plasma protein secara esensial terbatas pada kompartemen plasma dari tubuh dan tidak dapat berdifusi kedalam tempat kerja atau metabolisme dalam kompartemen lain. Metode untuk mensampling lymph dengan cara kanulasi pheriferal lymphatic anjing memperlihatkan bahwa konsentrasi penisillin dalam plasma secara signifikan lebih tinggi daripada yang terdapat dalam lymph; Namun, konsentrasi obat bebas adalah sama baik dalam lymph maupun dalam plasma. Hal ini juga diperlihatkandengan sederetan penicillin, dimana tingkat pengikatan protein plasma menurun, maka lokalisasi antibiotik dalam otak, paru paru dan jantung dari kelinci akan menaik. Penelitian tentang inhibisi (pengurangan) pengikatan sulfonamide secara *in vivo* dan *in vitro* telah memperlihatkan bahwa phenylbutazone, sulfinpyrazin, ethyl biscoum asetate, dan asam iophenoxat efektip dalam mengganti pengikatan sulfonamida terhadap protein dan dengan adanya albumin maka aktifitas antibakteri dari sulfonamida akan meningkat secara menyolok oleh bahan yang dapat menggantikan tempat (*displacing agent*). Telah diperlihatkan, sedikit dramatis, bahwa pemberian sulfinpyrazone pada tikus, bersama dengan sulfaethylthiadiazole atau sulfa methoxy pyridazine menghasilkan penurunan yang tajam dari konsentrasi total sulfonamida dalam plasma, tetapi konsentrasi obat bebas meningkat. Seiring dengan hal ini, konsentrasi sulfonamida dalam jaringan akan meningkat. Usaha untuk mempergunakan pergantian pengikatan obat secara kompetitip dalam klinik memberikan hasil dengan kesuksesan yang terbatas. Telah ditemukan bahwa hasil yang dicapai dengan mempertinggi aktifitas klinis dengan pemindahan (*displacement*) mungkin sulit untuk dapat dilakukan sebab dibutuhkan kompetitip inhibitor dalam jumlah yang banyak dan selalu tingkat perpindahan terbatas dan mungkin ditemukan pada manusia. Akibat yang dihasilkan dari pemindahan oleh obat pada pengikatan senyawa endogenous-protein juga telah dipertimbangkan dan diteliti. *Bilirubin*

©2003 Digitized by USU digital library

merupakan contoh yang penting sebab perpindahannya dapat menyebabkan terjadi keracunan pada bayi dan secara individual mekanisme konyugasi bilirubin terganggu. Telah diperlihatkan bahwa, salisilat dan sulfonamida dalam konsentrasi yang dipakai dalam klinik, dapat memindahkan bilirubin. Hal yang hampir sama, usaha untuk menghubungkan efek physiologi dan toksikologi dari beberapa benzoat dan salisilat terhadap pemindahan dari pengikatan hormon thyroid telah dilakukan. Juga telah diketahui bahwa obat yang terikat pada protein tidak aktip secara pharmakologi. Dari penelitian telah diketahui bahwa aktifitas antibiotik secara *in vitro* berbanding terbalik dengan jumlah pengikatan, aktifitas antipiretik na-salisilat pada kelinci berkurang bila diberikan bersama albumin, sehingga ada hubungan terbalik antara aktifitas bakteriostatik dengan pengikatan sulfonamida.

BAB. III. ARTI KLINIS DARI IKATAN OBAT-PROTEIN (clinical significance of drug- protein binding).

Umumnya obat berikatan dengan protein plasma secara bolak balik. Bila diteliti arti klinis dari fraksi obat yang terikat, maka penting untuk diketahui apakah penelitian telah mempergunakan konsentrasi pharmakologi atau konsentrasi terapi obat dalam plasma. Seperti diketahui, bahwa fraksi obat yang terikat dapat berubah dengan perubahan konsentrasi obat dalam plasma dan dosis dari pemberian obat. Dengan tambahan, bahwa konsentrasi plasma protein pasien harus diteliti. Bila pasien mempunyai konsentrasi plasma protein yang rendah, maka, dalam dosis yang diberikan, konsentrasi dari bioaktip obat bebas (tidak berikatan) mungkin lebih tinggi dari yang diharapkan. Konsentrasi protein plasma dikontrol dengan sejumlah variabel, meliputi : (1) Sintesa protein, (2) Katabolisme protein, (3) Distribusi albumin antara lapisan intravaskuler dan extravaskuler, dan (4) Eliminasi berlebihan dari plasma protein, terutama albumin. Sejumlah penyakit, umur, trauma, dan lingkungan yang berhubungan akan memepengaruhi konsentrasi protein plasma (tabel. 11, 12, 13).

©2003 Digitized by USU digital library

Tabel 11 Physiologic and Pathologic Conditions Altering Protein Concentrations in Plasma[a]

	ALBUMIN	α_1-GLYCOPROTEIN	LIPOPROTEIN
Decreasing	Age (geriatric, neonate) Bacterial pneumonia Burns Cirrhosis of liver Cystic fibrosis GI disease Histoplasmosis Leprosy Liver abscess Malignant neoplasms Malnutrition (severe) Multiple myeloma Nephrotic syndrome Pancreatitis (acute) Pregnancy Renal failure Surgery Trauma	Fetal concentrations Nephrotic syndrome Oral contraceptives	Hyperthyroidism Injury Liver disease? Trauma
Increasing	Benign tumor Exercise Hypothyroidism Neurological disease? Neurosis Paranoia Psychosis Schizophrenia	Age (geriatric) Celiac disease Crohn's disease Injury Myocardial infarction Renal failure Rheumatoid arthritis Stress Surgery Trauma	Diabetes Hypothyroidism Liver disease? Nephrotic syndrome

[a] In the conditions listed, the protein concentrations are altered, on average, by 30% or more, and in some cases by more than 100%.

From Tozer (1984), with permission.

Tabel 12 Protein Binding in Normal (Norm) Renal Function, End-Stage Renal Disease (ESRD), During Hemodialysis (HD), and in Nephrotic Syndrome (NS)

	NORM (% BOUND)	ESRD (% BOUND)	HD (% BOUND)	NS (% BOUND)
Azlocillin	28	25		
Bilirubin		Decreased		
Captopril	24	18		
Cefazolin	84	73	22	
Cefoxitin	73	20		
Chloramphenicol	53	45	30	
Chlorpromazine	98	98		
Clofibrate	96		89	
Clonidine	30	30		
Congo red		Decreased		
Dapsone		Normal		
Desipramine	80	Normal		
N-desmethyldiazepam	98	94		
Desmethylimipramine	89	88		
Diazepam	99	94		
Diazoxide (30 μg/mL)	92	86	83	
(300 μg/mL)	77	72		

©2003 Digitized by USU digital library

Dicloxacillin	96	91		
Diflunisal	88	56		39
Digitoxin	97	96	90	96
Digoxin	25		22	
Doxycycline	88	71		
Erythromycin	75	77		
Etomidate	75	57		
Fluorescein	86	Decreased		
Furosemid	96	94		93
Indomethacin		Normal		
Maprotiline	90	Normal		
β-methyldigoxin	30		19	
Methyl orange		Decreased		
Methyl red		Decreased		
Morphine	35	31		
Nafcillin	88	81		
Naproxen	75	21		
Oxazepam	95	88		
Papaverine	97	94		
Penicillin G	72	36		
Pentobarbital	66	59		
Phenobarbital	55	Decreased		
Phenol red		Decreased		
Phenylbutazone	97	88		
Phenytoin	90	80	93	81
Pindolol	41	Normal		
Prazosin	95	92		
Prednisolone (50 mg)	74		65	64
(15 mg)	87	88		85
Propoxyphene	76	80		
Propranolol	89	89	90	
Quinidine	88	86	88	
Salicylate	94	85		
Sulfadiazine		Decreased		
Sulfamethoxazole	74	50		
Sulfonamides		Decreased		
Strophantin	1		2	
Theophylline	60	Decreased		
Thiopental	72	44		
Thyroxine		Decreased		
Triamterene	81	61		
Trimethoprim	70	68		70
Tryptophan	75	Decreased		
d-tubocurarine	44	41		
Valproic acid	85	Decreased		
Verapamil	90	Normal		
Warfarin	99	98		

From Keller et al (1984), with permission.

Tabel 13 Factors That Decrease Plasma Protein Concentration

MECHANISM	DISEASE STATE
Decreased protein synthesis	Liver disease
Increased protein catabolism	Trauma, surgery
Distribution of albumin into extravascular space	Burns
Excessive elimination of protein	Renal disease

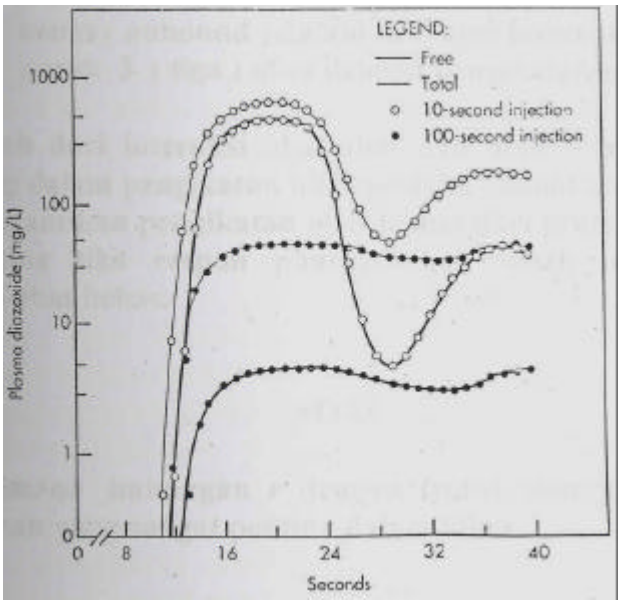
Sebagai contoh, penyakit hati dihasilkan pada penurunan konsentrasi albumin plasma yang menyebabkan penurunan sintesa protein. Pada *nephrotic syndrome*, penimbunan sisa hasil metabolisme, seperti *urea,* dan *asam urat*, demikian juga penimbunan hasil metabolisme obat, mungkin mengubah ikatan obat-protein. Beberapa luka bakar dapat menyebabkan peningkatan distribusi albumin kedalam cairan ekstrasellular, yang menghasilkan konsentrasi plasma albumin yang sedikit .

Pada penyakit genetic berikut, kualitas protein yang disintesa dalam plasma mungkin berubah disebabkan oleh perubahan rangkaian asam amino. Baik penyakit hati kronis dan penyakit saluran kemih, seperti uremia, dapat menyebabkan perubahan dalam kualitas sintesa protein plasma. Perubahan kualitas protein dapat diperlihatkan dengan perubahan *tetapan assosiasi* atau *affinitas obat* untuk protein. Bila ikatan kuat dari obat-protein digantikan ikatannya oleh obat atau bahan kedua, peningkatan yang tajam dari konsentrasi bebas obat dalam plasma mungkin ditemukan, sampai keracunan. Sebagai contoh , peningkatan level *warfarin bebas* merupakan akibat dari peningkatan pendarahan bila warfarin diberikan bersama sama dengan phenylbutazone, yang akan berkompetisi *untuk tempat pengikatan protein yang sama (O'* Reilly, 1973; Udall, 1970).

Albumin diketahui mempunyai 2 (dua) tempat pengikatan yang dipakai bersama untuk pengikatan berbagai obat (*MacKichan, 1992*). *Tempat pengikatan I* digunakan oleh phenylbutazone, sulfonamide, phenytoin, dan asam valproat. *Tempat pengikatan II* digunakan oleh penicillin semi sintetik, probeneside, asam lemak rantai sedang, dan benzodiazepine. Beberapa obat akan berikatan dengan kedua tempat diatas. Perpindahan ditemukan bila obat kedua berperanan akan berkompetisi dengan obat mula mula untuk tempat pengikatan yang sama pada protein. Meskipun secara umum diduga bahwa tempat pengikatan adalah seragam, namun ada beberapa bukti yang menyatakan adanya sifat allosteric pada pengikatan protein alamiah. Hal ini berarti bahwa pengikatan obat akan memodifikasi konformasi protein, dengan kata lain bahwa pengikatan obat dipengaruhi sifat alamiah pengikatan molekul yang lain dari obat. Pengikatan oksigen terhadap haemoglobine merupakan contoh penelitian biokimia yang baik dimana pengikatan awal dari suatu oksigen terhadap *besi* pada bahagian *heme* dipengaruhi oleh pengikatan molekul oksigen yang lain. Aspek yang kurang diketahui tentang pengikatan protein adalah efek pengikatan terhadap *intensitas* dan *pharmakodinamik* dari obat setelah *pemberian intravena.* Injeksi *IV* yang cepat dapat mempertinggi konsentrasi obat bebas dari beberapa pengikatan obat–protein yang tinggi dan tentunya mempertinggi intensitas kerjanya. Sellers dan Koch-Weser (1973) melaporkan adanya *peningkatan* yang dramatis pada *efek hypotensive* bila *diazoxide* diinjeksikan *cepat IV* dalam 10 detik versus diinjeksikan lambat dalam 100 detik. Diazoxide berada dalam *bentuk bebas* sebesar 9,1 % dan 20,6 % bila level serum secara berturut turut adalah 20 dan 100 µg/ ml.

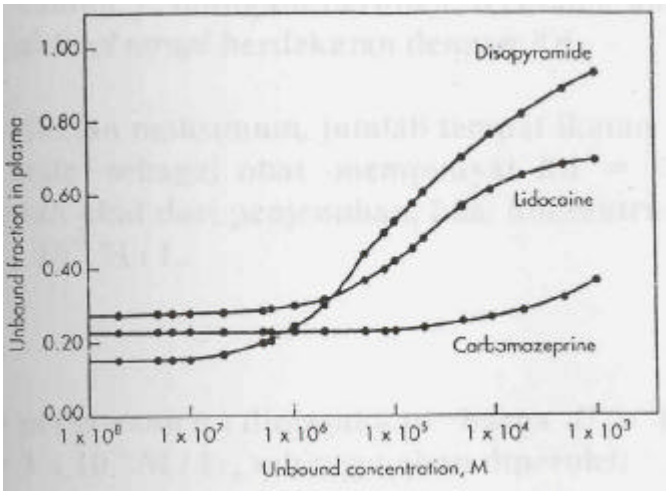
Gambar 16, memperlihatkan konsentrasi sementara yang tinggi dari diazoxide bebas, yang dihasilkan setelah *injeksi IV* yang cepat menyebabkan dilatasi arteri yang maksimal dan efek hipotensive karena penjenuhan awal dari tempat pengikatan protein. Sebaliknya, bila diazoxide diinjeksikan lebih lambat diatas 100 detik, level serum diazoxide akan rendah, sebab pengikatan dan distribusi obat. Injeksi diazoxide secara lambat menghasilkan penurunan yang sedikit pada tekanan darah, meskipun dosis total obat yang diinjeksikan adalah sama.

©2003 Digitized by USU digital library



Gambar 16. Kalkulasi dari time course dari konsentrasi diazoxide total dan bebas dalam arteriol.

Meskipun, umumnya mempunyai pengikatan yang lurus pada dosis terapi, pada beberapa pasien, konsentrasi obat bebas dapat meningkat secara cepat dengan kenaikan konsentrasi obat sehingga tempat pengikatan menjadi jenuh. Sebagai contoh, dapat diperhatikan gambar 17, untuk Lidocain (*Mac Kichan, 1991*)



Gambar 17, Simulasi memperlihatkan perubahan dalam fraksi obat bebas (unbound) dalam berbagai konsentrasi molar obat, untuk 3 (tiga) obat dengan pengikatan protein.

Sifat alamiah dari interaksi obat-obat dan obat–hasil metabolisme juga penting dalam pengikatan obat-protein. Dalam kasus ini, satu obat dapat menggantikan pengikatan obat kedua dari protein, menyebabkan kenaikan tiba tiba respon pharmakologi sebab peningkatan dari konsentrasi obat bebas.

©2003 Digitized by USU digital library

SOAL .

1. Bagaimana hubungan *r* dengan fraksi obat yang terikat (f_u), keadaan yang sangat penting dalam klinis.

   Jawab.
   r adalah rasio dari jumlah mol obat terikat / jumlah mol albumin. Penentuan *r* menyatakan dimana tempat pengikatan obat yang ditemukan pada albumin (atau protein yang lain) dan penjenuhan dari konsentrasi obat.

   f_u berdasarkan kepada total konsentrasi obat dan digunakan untuk menentukan konsentrasi obat yang tidak terikat dari jumlah total dalam plasma. Nilai dari f_u diramalkan selalu tertentu. Namun, f_u mungkin berubah, terutama untuk obat yang mempunyai *level terapi* berdekatan dengan *K*d.

2. Pada pengikatan maksimum, jumlah tempat ikatan adalah *n*. Disopyramide sebagai obat mempunyai *K*d = 1 x 10^{-6} M / L. Berapa jarak obat dari penjenuhan, bila konsentrasi obat bebas adalah 1 x 10^{-6} M / L.

   Jawab.
   Kedalam persamaan 6) dimasukkan harga *D* = 1 x 10^{-6} M / L dan *K*d = 1 x 10^{-6} M / L , sehingga akan diperoleh

   $$r = \frac{n}{2}$$

   Bila *n* = 1 dan konsentrasi obat yang tidak terikat (bebas) sama dengan *K*d, maka pengikatan obat terhadap protein adalah setengah dari penjenuhan. Yang menarik adalah, bila (*D*) lebih besar dari *K*d, *K*d dapat dihilangkan dari persamaan 6), dan *r* = *n*, (*r* tidak tergantung pada konsentrasi atau jenuh total).
   Bila *K*d > (*D*), (*D*) dihilangkan sebagai penyebut dalam persamaan 6), dan *r* tidak tergantung pada *n* / *K*d (*D*), atau *n K*a (*D*). Pada keadaan ini, tetapan disosiasi, *K*d lebih besar daripada konsentrasi obat, (D), jumlah tempat ikatan secara langsung sebanding dengan jumlah tempat pengikatan, tetapan asosiasi pengikatan (juga disebut *tetapan affinitas*, dan konsentrasi obat bebas). Hubungan ini juga menjelaskan mengapa obat dengan *K*a yang tinggi dapat tidak mempunyai persen pengikatan obat yang tinggi sebab jumlah tempat pengikatan *n* mungkin berbeda dari satu obat terhadap yang lain.

3. Bagaimana pengaruh sifat fisika, seperti *koefisien partisi* terhadap distribusi obat?

   Jawab.
   Partisi menunjukkan distribusi relatif obat dalam fase lipid dan fase berair. Umumnya, koefisien partisi (P_{minyak} / $_{air}$) yang tinggi mempengaruhi distribusi jaringan dan sampai volume distribusi yang besar. Partisi merupakan factor yang utama untuk menentukan distribusi obat sampai pengikatan obat dengan protein.

4. Apa parameter yang digunakan, untuk menyatakan bahwa setengah dari tempat pengikatan protein telah terisi ?

©2003 Digitized by USU digital library

Jawab.
Rasio, *r*, dinyatakan sebagai rasio dari jumlah mol obat yang terikat dengan jumlah mol protein dalam sistem. Untuk keadaan sederhana satu tempat pengikatan, *r* menggambarkan tempat pengikatan yang terisi secara proporsional.

Harga *r* dipengaruhi oleh :

1. Tetapan asosiasi pengikatan.
2. Konsentrasi obat bebas.
3. Jumlah tempat pengikatan per mol protein.

Bila (*D*), atau konsentrasi obat bebas, sama dengan 1 (atau tetapan dissosiasi *K*), berdasarkan persamaan 22, pengikatan protein sebesar 50 % terhadap obat pada perbandingan antara obat dan protein sebesar 1 : 1 (Hal ini akan lebih mudah dibuktikan dengan mensubsitusikan (*D*) pada bahagian kanan persamaan dan ditentukan *r*.). Untuk obat dengan dengan *n* tempat pengikatan, maka 50 % tempat pengikatan akan terisi bila [*D*] = 1 / [K_a (n – 1)]. Namun, persamaan ini, menggambarkan pengikatan *in vitro* bila konsentrasi obat tidak berubah, sehingga, kesimpulan ini terlihat seperti terbatas.

5. Selalu dianggap, bahwa pengikatan (binding) yang liner ditemukan dalam dosis terapi. Apakah resiko potensial dari anggapan ini ?

   Jawab.
   Pengikatan protein dapat menjadi jenuh dalam berbagai Konsentrasi obat pada pasien dengan protein yang kurang baik atau dengan tempat pengikatan telah terisi dengan sisa metabolisme yang dihasilkan selama masa sakit (misalnya penyakit ginjal). *Diazoxide* merupakan contoh dari pengikatan non liner pada dosis terapi.

6. Naproxen (Naprosyn – Syntex) adalah obat anti inflamasi non steroid (NSAID) yang mempunyai pengikatan yang tinggi terhadap protein plasma > 99 %. Coba jelaskan mengapa konsentrasi plasma naproxen bebas meningkat, pada pasien dengan penyakit liver kronis akibat alkohol dan kemungkinan bentuk lain dari cirrhosis ; dimana, total konsentrasi obat dalam plasma menurun ?

   Jawab.
   Hati (liver) penting untuk sintesa plasma protein. Pada penyakit hati kronis akibat alkohol atau *cirrhosis*, plasma protein yang disintesa dalam hati lebih sedikit, sehingga menghasilkan konsentrasi protein dalam plasma akan rendah. Maka, naproxen dalam dosis yang diberikan, akan berkurang berikatan dengan plasma protein akan berkurang, dan konsentrasi obat total dalam darah sedikit.

7. Bila obat terikat sebesar 99 %, hal ini berarti bahwa cendrung telah jenuh (*saturasi*), benar atau salah ?

Jawab.
Salah. Persen yang terikat merupakan persen total obat yang terikat. Untuk beberapa obat, persen pengikatan mungkin = 99%. Penjenuhan mungkin lebih baik diramalkan dengan melakukan pendekatan dengan Scatchart plot dan dengan menentukan " *r* " yaitu jumlah mol obat yang berikatan dibagi dengan jumlah mol protein. Bila *r* adalah 0,99 maka seluruh tempat pengikatan telah berisi. Harga f_b atau fraksi obat terikat, digunakan untuk menentukan f_u, $f_u = 1 - f_b$.

8. Apa yang menyebabkan terjadinya waktu paruh distribusi yang panjang pada organ tubuh, bila aliran darah kedalam jaringan cepat ?

   Jawab.
   Umumnya, waktu paruh distribusi yang panjang disebabkan oleh jaringan/organ mempunyai konsentrasi yang tinggi yang penyebabnya adalah salah satu dari pengikatan obat secara intrasellular atau afinitas yang tinggi untuk distribusi jaringan. Kemungkinan lain, obat mungkin dimetabolisme secara lambat lambat didalam jaringan.

9. Bagaimana pengikatan obat protein mempengaruhi eliminasi obat ?

   Jawab.
   Hampir seluruh obat dianggap adalah mempunyai sifat pengikatan terbatas (*restrictively bound*) dan pengikatan akan mengurangi bersihan (*clearance*) dan eliminasi obat. Namun beberapa yang bersifat tidak terbatas pengikatan, obat mungkin akan dibersihkan dengan mudah. Perubahan dari pengikatan tidak mempengaruhi kecepatan eliminasi dari obat ini. Beberapa obat, seperti beberapa penicillin semi-sintetik, yang berikatan dengan plasma protein, mungkin dieksresi secara aktip dalam ginjal. Kecepatan eliminasi dari obat ini tidak dipengaruhi oleh pengikatan protein.

10. Sebutkan senyawa makromolekul yang berperanan dalam pengikatan obat dengan protein.

    Jawab.
    Albumin, a1- asam glycoprotein, dan lipoprotein. Untuk beberapa obat dan hormon, mungkin terdapat pengikatan protein yang spesifik.

DAFTAR BACAAN.

Leon Shargel, Andrew Yu ; *Applied Biopharmaceutics & Pharmakokinetics*, fourth edition, halaman 281 –321, 1999, USA.

Remingtons ; *Pharmaceutical Sciences*. halaman 206 – 210. USA.