

Penelitian

Hubungan Kadar Albumin dan Enrofloksasin dalam Plasma Anjing yang Diterapi Enrofloksasin

(The Correlation of Albumin and Enrofloxacin Level in Plasma of Dogs that Treated with Enrofloxacin)

Agustina Dwi Wijayanti*, Dwi Cahyo Budi Setiawan

Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna No.2 Karangmalang Yogyakarta 55281 Indonesia

*Penulis untuk korespondensi : tinabdy@ugm.ac.id

Diterima 29 September, Disetujui 20 Desember 2016

ABSTRAK

Ikatan protein plasma terutama albumin dengan obat merupakan faktor penting yang harus dipertimbangkan dalam terapi pada hewan. Hewan sakit umumnya mengalami hipoalbuminemia yang diakibatkan oleh kurangnya asupan nutrisi atau gangguan metabolisme protein pembentukan albumin akibat agen penyakit. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui hubungan kadar albumin pada pasien anjing yang sedang diterapi enrofloksasin dengan kadar enrofloksasin dalam plasma, untuk mengetahui seberapa besar persentase obat bebas yang memiliki nilai terapeutik. Sampel darah diambil dari 10 pasien anjing dewasa berbagai ras satu jam setelah injeksi intra muskuler enrofloksasin dosis terapi (10 mg/kg berat badan) dan dimasukkan ke dalam tabung mengandung heparin. Sebagai pembanding juga dilakukan sampling darah terhadap 5 ekor anjing dewasa sehat berbagai ras untuk melihat kadar albumin dan kadar obat secara in vitro. Plasma diperoleh setelah proses sentrifugasi dan albumin diukur dengan metode bromocresolgreen serta kadar enrofloksasin diukur secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Hasil pengukuran kadar albumin menunjukkan perbedaan yang signifikan antara anjing sehat dan sakit yaitu 3,10 : 2,24 g/dL ($P < 0,05$). Hasil pengukuran kadar enrofloksasin plasma anjing sakit menunjukkan rerata kadar 1,10 $\mu\text{g/mL}$, atau setara pada kadar albumin 1,7-2,6 g/dL pada uji kadar obat secara in vitro. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin rendah kadar albumin maka kadar enrofloksasin yang terukur semakin tinggi, yang menunjukkan semakin rendah persentase ikatan albumin-obat.

Kata kunci: anjing, ikatan albumin, enrofloksasin, kromatografi, plasma darah

ABSTRACT

The plasma protein-drug mainly albumin binding plays an important role in therapy management of domestic animals. Many diseases generates the decrease of albumin that may caused by the lack of protein intake or the protein metabolism disorder. This research has deducted to study the correlation of albumin level and drug concentration in plasma of dog that received the enrofloxacin therapy to measure the percentage of free drug. The plasma were collected from 10 of mature sick dogs of various breeds an hour after injected therapeutic doses of enrofloxacin (10 g/kg) intramuscularly. Five healthy dogs were taken their blood to collect the plasma to measure the albumin and enrofloxacin level in vitro. Plasma collected after centrifugation, albumin and enrofloxacin levels were measured with bromocresol green and high performance liquid chromatography methods respectively. The results showed the significantly different of albumin levels beetwen healthy and sick dogs (3.10 : 2.24 g/dL, $P < 0.05$). The enrofloxacin concentration measurement yielded the average of 1.10 $\mu\text{g/mL}$ of sick dogs. This value was similar as value of enrofloxacin concentration of in vitro experiment at albumin level of 1.7-2.6 g/dL. It concluded that the lower of albumin level the higher enrofloxacin concentration of plasma, that it might explained the reducing of percentage the albumin-drug binding.

Keywords: albumin binding, blood plasma, chromatography, dog, enrofloxacin

PENDAHULUAN

Saat ini enrofloksasin merupakan obat yang paling banyak digunakan untuk penyakit infeksi pada hewan kesayangan. Meskipun belum ada data statistik mengenai kuantitas penggunaan obat ini di veteriner, banyak praktisi menggunakan obat ini karena cakupan indikasi yang luas serta jangkauan keragaman spesies (anjing, kucing, burung, ruminansia, hingga reptilia/satwa liar). Terbatasnya data tentang nilai albumin serta ikatan protein-plasma enrofloksasin terhadap kesembuhan pasien, membuat keputusan terapi yang dibuat hanya berdasarkan data empiris dan sebagian kecil nilai farmakokinetik obat seperti volume distribusi, kadar maksimal dalam darah atau waktu paruh. Kasus kegagalan terapi antibiotik pada veteriner banyak disebabkan karena gagalnya fungsi obat yang disebabkan oleh kurangnya suportif terhadap kondisi pasien.

Kondisi patofisiologis seperti diare, muntah, demam dan anoreksia sering menyertai suatu penyakit dan menyebabkan tubuh kekurangan cairan atau dehidrasi serta berubahnya kadar protein plasma, terutama albumin. Penelitian yang dilakukan oleh Zini *et al.* (1990) membuktikan bahwa ikatan protein suatu obat yang memiliki afinitas protein tinggi akan dipengaruhi oleh perubahan kadar protein plasma. Enrofloksasin merupakan golongan fluoroquinolon yang banyak digunakan dalam pengobatan veteriner terutama untuk kondisi septicemia dan infeksi saluran pernapasan, ekskretori, kulit, jaringan lunak, persendiaan dan sumsum tulang. Golongan ini bersifat spektrum luas serta memiliki sifat bakterisidal tinggi. Nilai ketersediaan hayati enrofloksasin pada anjing adalah 80% dan waktu paruh 4-5 jam (Plumb, 1999), namun persentase ikatan protein plasma pada beberapa spesies hewan lain bervariasi antara 15-40% (Nites *et al.*, 2011). Penelitian Zeitlinger *et al.* (2004), menghasilkan penurunan efektivitas lebih dari 1 log₁₀ cfu/mL dengan penambahan albumin pada media agar untuk golongan fluoroquinolon yaitu moksifloksasin. Menurut Uldemolins *et al.* (2011), beberapa obat dengan nilai ikatan protein plasma 85-95% (ceftriaxone dan ertapenem) mengalami peningkatan nilai Vd dan Cl (klirens) hingga dua kali lipat pada penderita penyakit kritis disertai hipoalbuminemia. Studi ikatan protein plasma dengan antibiotik belum banyak dilakukan; suatu studi ikatan albumin dengan antiviral dengan kehadiran ampisilin telah dilakukan oleh Vijayaraj *et al.* (2011). Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh kadar albumin terhadap ikatan albumin-enrofloksasin serta kadar

enrofloksasin dalam plasma, untuk memperbaiki terapi obat menjadi lebih efektif.

BAHAN DAN METODE

Koleksi sampel

Sampel plasma dikoleksi dari 10 pasien anjing yang didiagnosa sakit (dermatitis, anemia, enteritis, dermatomikosis, keratitis, dan miasis) yang secara klinis terindikasi terjadi hipoalbuminemia dan diterapi enrofloksasin 10 mg/kg bb secara intramuskuler dari dokter hewan praktisi, klinik dan rumah sakit hewan di wilayah DI Yogyakarta. Darah diambil dari vena cephalica sebanyak 3 mL dalam waktu 1 jam setelah injeksi obat, ditampung dalam tabung dengan antikoagulan heparin, selanjutnya disentrifugasi 2500 G selama 5 menit dan dikoleksi plasmanya. Plasma diidentifikasi dan disimpan dalam lemari pembeku hingga dianalisis lebih lanjut. Sebagai pembanding dan untuk uji ikatan albumin-obat (ALB-enrofloksasin) digunakan plasma dari anjing sehat dan tidak disuntik obat (n=5). Analisis kadar albumin selanjutnya dilakukan terhadap plasma anjing sehat dan sakit dengan menggunakan metode bromocresol green, dan kadar enrofloksasin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Pembuatan standar ALB, standar uji dan pengujian ikatan

Standar ALB dibuat dari plasma kontrol (*pooled plasma* dari anjing sehat) melalui pengenceran plasma anjing sehat menggunakan larutan saline isotonis bufer fosfat. Larutan bufer terdiri dari 1/15 M Na₂HPO₄ dan 1/15 M NaH₂PO₄ dalam 50 mM NaCl. Konsentrasi larutan ALB anjing 3,5 ug/mL dibuat sebagai standar. Selanjutnya dibuat pengenceran dengan konsentrasi 100% (3,5 ug/mL), 75% (2,6 ug/mL), 50% (1,7 ug/mL) dan 25% (0,8).

Pengujian ikatan protein dilakukan mengacu metode Ikenoue *et al.* (2000). Enrofloksasin (sediaan cair) dilarutkan dalam setiap pengenceran plasma-ALB hingga mencapai kisaran konsentrasi terapi dalam darah (rerata 1 ug/mL), divortex dan diinkubasi 37 °C selama 60 menit. Selanjutnya untuk menentukan kadar obat bebas dilakukan sentrifugasi plasma 2500 G selama 10 menit. Supernatan diambil dan dianalisis kadarnya dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Persentase ikatan protein dihitung menggunakan rumus :

$$\frac{\text{konsentrasi total obat} - \text{obat bebas}}{\text{konsentrasi total obat}}$$

Konsentrasi total obat merupakan kadar enrofloksasin yang diukur dari plasma anjing sakit.

Pengukuran Obat dari Sampel

Enrofloksasin yang diukur dari sampel plasma anjing sakit merupakan konsentrasi total obat (*bound* dan *unbound/free drug*). Untuk mengendapkan protein plasma dari sampel maka ditambahkan asam trikloroasetat 10% dengan perbandingan 1:1. Sampel selanjutnya divortex dan disentrifus 2500 G selama 5 menit, dan supernatan dikoleksi. Selanjutnya supernatan diencerkan dengan bufer fosfat perbandingan 1:1, dan diinjeksikan ke dalam kolom KCKT. Analisis kadar secara KCKT (merek Shimadzu model 6,1, sistem isokratik, fase terbalik) menggunakan fase gerak larutan asam oksalat: asetonitril: metanol (6:3:1), dengan kecepatan alir 1 mL/menit, kolom ODS Shimpack diameter 5 μm , oven 30 °Celsius dan detektor UV pada panjang gelombang 278 nm. Perangkat KCKT menggunakan piranti lunak Class VP versi 1.1.

HASIL

Hasil pengukuran kadar albumin dan pengukuran kadar enrofloksasin pada anjing sakit tersaji pada Tabel 1.

Rerata kadar albumin antara anjing sehat (3,18 g/dL) dan sakit (2,24 g/dL) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Rerata kadar enrofloksa-

sin pada anjing sakit terukur 1,10 $\mu\text{g/mL}$ pada kondisi kadar albumin berkisar antara 1,57- 2,82 g/dL.

Hasil Pengujian *in vitro* pada *pooled* plasma anjing sehat terhadap persentase ikatan ALB-enro dapat dilihat pada Tabel 2. Persentase ikatan ALB-enro menunjukkan penurunan seiring berkurangnya kadar albumin.

Hasil validasi pengukuran standar enrofloksasin menggunakan KCKT diperoleh garis linear dengan persamaan $Y = ax + b$, diperoleh nilai $R^2 = 0,99$ (Gambar 1). Titik ordinat sebagai kurva standar diperoleh dari seri pengenceran kadar enrofloksasin mulai 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, dan 0,01 $\mu\text{g/mL}$. Nilai limit deteksi (LOD) adalah 0,005 dan limit kuantifikasi pengukuran (LOQ) 0,01 $\mu\text{g/mL}$. Nilai kadar obat ditentukan dengan menghitung area sesuai persamaan garis linear dengan pengenceran kadar enrofloksasin sebagai kurva standar.

PEMBAHASAN

Hasil pengukuran kadar albumin menunjukkan bahwa kondisi patologis (sakit) berpengaruh terhadap kadar protein plasma termasuk albumin. Tabel 1 menunjukkan bahwa pada kondisi sakit, anjing akan mengalami penurunan kadar albumin dibandingkan dalam kondisi sehat ($P < 0,05$). Meskipun beberapa hewan sakit menunjukkan kadar albumin di atas 2,5 g/dL, namun kondisi sakit tidak selalu menyebabkan kondisi hipoalbuminemia. Hiperalbuminemia pada anjing dapat disebabkan karena kondisi dehidrasi, hypoadrenocorticism atau adanya hepatoseluler karsinoma (Cooper *et al.*,

Tabel 1. Hasil pengukuran kadar albumin dan enrofloksasin pada anjing

Kode anjing (sehat)	Kadar albumin (g/dL)	Kode anjing (sakit)	Kadar albumin (g/dL)	Kadar enrofloksasin ($\mu\text{g/mL}$)
H1	3,00	S1	1,90	1,31
H2	2,61	S2	1,84	1,24
H3	2,47	S3	1,72	1,36
H4	4,88	S4	2,66	0,98
H5	2,97	S5	2,82	1,31
		S6	2,69	1,29
		S7	1,57	1,13
		S8	2,79	1,17
		S9	1,93	1,22
		S10	2,47	1,21
Jumlah	15,93		22,45	11,01
Rerata	3,18 ^a		2.24 ^b	1,10

Tabel 2. Hasil pengujian ikatan albumin-enrofloksasin in vitro

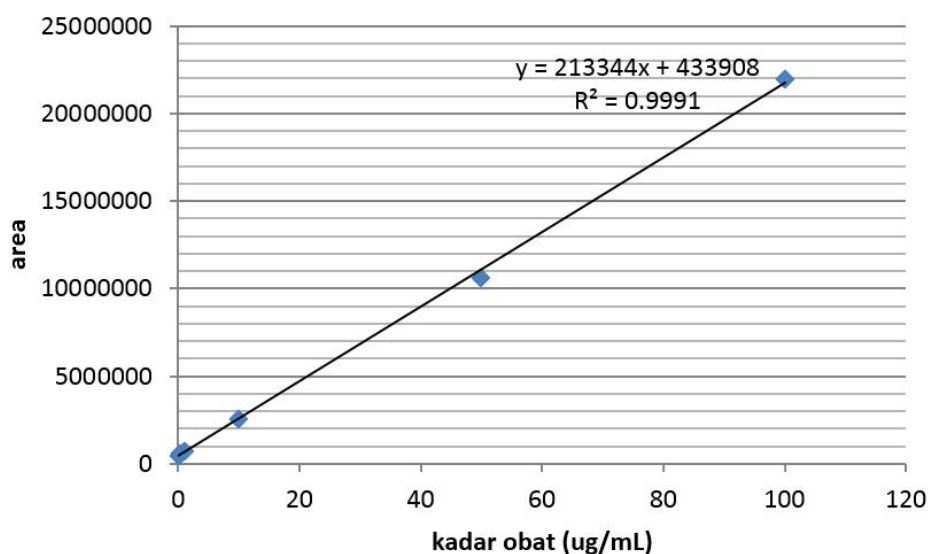
Konsentrasi albumin (g/dl)	Konsentrasi enrofloksasin yang ditambahkan	Kadar Enrofloksasin terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Perbandingan kadar obat dengan nilai albumin normal	Persentase ikatan alb-enro
3,5 (100%, normal)	1 mg/mL	0,035	-	99,99%
2,6 (75%)	1 mg/mL	0,483	13,7 x	99,95%
1,7(50%)	1 mg/mL	1,680	48,0 x	99,83%
0,8(25%)	1 mg/mL	1,730	49,4 x	99,82%

2009). Menurut Belpaire *et al.* (1987) Sebanyak 11% penurunan kadar albumin pada anjing disebabkan karena kondisi inflamasi (pioderma, endometritis dan abses sub kutan), sementara Condner & Maslin (1992), menyatakan infeksi *Ehrlichia canis* akut dapat menurunkan albumin hingga 43%.

Ikatan protein plasma-obat adalah faktor yang harus diperhatikan sehubungan dengan nilai distribusi obat, karena ikatan ini memengaruhi jumlah fraksi obat bebas yang mampu melakukan penetrasi ke jaringan atau organ. Kadar albumin sangat lazim menurun pada kondisi pasien yang buruk, dimana penurunan yang terjadi 40-50%. Kondisi ini akan memengaruhi tingkat ikatan albumin-obat terutama obat dengan ikatan protein tinggi, serta merubah sifat farmakokinetik dan farmakodinamik obat, meskipun kondisi ini masih sangat jarang diperhitungkan (Ulldemolins *et al.*, 2011).

Tabel 2 menggambarkan kondisi di mana semakin rendah kadar albumin plasma maka kadar obat bebas yang terukur semakin tinggi. Secara umum sangatlah penting dipahami bahwa untuk obat-obat yang memiliki afinitas tinggi terhadap protein plasma nilai obat bebas akan sangat ditentu-

tukan oleh kadar protein plasma, baik itu albumin atau globulin. Albumin sendiri lebih diperhitungkan karena merupakan protein plasma dengan persentase paling besar (50%). Enrofloksasin memiliki nilai ikatan protein antara 15-40% pada beberapa spesies hewan (Nites *et al.*, 2011). Pada penelitian ini terlihat bahwa kenaikan kadar obat terjadi pada kadar albumin 75% yaitu 13,7 kali dari kadar 100% (3,5 g/dL), 48 dan 49,4 kali pada kadar albumin 50 dan 25%. Persentase ikatan albumin-enrofloksasin juga semakin turun dengan berkurangnya kadar albumin, yang menggambarkan adanya kenaikan fraksi obat bebas. Pengukuran kadar obat pada anjing sakit menunjukkan rerata kadar 1,10 $\mu\text{g/mL}$. Nilai ini cukup tinggi dan melebihi nilai kadar hambat minimal beberapa bakteri yaitu *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, dan *Klebsiella pneumonia* sebesar 0,008-0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Walker & Dowling, 2006; Dmitrova, 2007). Namun demikian untuk beberapa bakteri patogen yang lain yaitu *Bordetella bronchiseptica*, *Enterococcus sp.* dan *Pseudomonas spp.*, nilai tersebut masih dalam kisaran kadar hambat minimal yaitu 0,5 – 2



Gambar 1 Kurva standar enrofloksasin

µg/mL (Walker & Dowling, 2006; Dmitrova, 2007).

Studi pada manusia menunjukkan bahwa turunnya kadar albumin akan mempengaruhi farmakokinetik dan farmakodinami suatu obat. Shimoda *et al.* (1989) menyatakan turunnya kadar albumin akan merubah tingkat disposisi obat, Vree *et al.*, menemukan korelasi antara perubahan nilai volume distribusi dan klirens plasma midazolam dengan kadar albumin. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh turunnya kadar albumin pada anjing terhadap fraksi obat bebas dan perubahan ikatan albumin-enrofloksasi. Rerata kadar enrofloksasin dalam darah anjing (1,10 µg/mL) pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian enrofloksasin pada kondisi hipoalbuminemia memiliki kemungkinan toksisitas karena melebihi batas atas kadar hambat minimal beberapa bakteri, meskipun asumsi ini masih harus dilanjutkan dengan penelitian lebih lanjut. Sebagaimana penelitian sebelumnya, faktor ikatan albumin-obat dan kadar albumin pasien juga penting dipertimbangan dalam pemberian antibiotik untuk menghindari efek obat yang tidak diharapkan, misalnya toksisitas atau kadar sub terapi.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”

DAFTAR PUSTAKA

- Belpaire FM, DeRick A, Dello C, Fraeyman N, Bogaert MG. 1987. A 1-acid glycoprotein and serum binding of drugs in healthy and diseased dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 10: 43-8,
- Condner EC, Maslin WR. 1992. Investigation of renal protein loss in dogs with acute Experimentally induced Ehrlichia canis infection. *American Journal Veterinary Research* 53(3): 294-9.
- Cooper ES, Wellman ML, Carsillo ME. 2009. Hyperalbuminemia associated with hepatocellular carcinoma in dog. *Veterinary Clinically Pathology* 38(4): 516-520.
- Dimitrova DJ, Lashev LD, Yanef SG, Pandova B. 2007. Pharmacokinetics of enrofloxacin in turkeys. *Research In Veterinary Science* 82:392-397.
- Nites K. 2011. Disposition kinetics and in vitro plasma protein binding of enrofloxacin following single dose intraperitoneal administration in albino rats. *Pharmacology Science Mon* 2(3):83-97.
- Plumb DC. 1999. *Veterinary Drug Handbook*, 3rd ed. 122-123, Iowa State University Press/Ames. 125-130.
- Shimoda M, Kokue E, Hayama T, Vree TB. 1989. Effect of albumin distribution - A simulation analysis of the effect of altered albumin distribution on the apparent volume of distribution and apparent elimination rate constant of drugs. *Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition* 11: 87-91.
- Ulldemolins M, Robert JA, Rello J, Paterson DL, Lipman J. 2011. The effect of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients. *Clinical Pharmacokinetic* 50(2): 99-110.
- Vijayaraj S, Divya SK, KeerthiVP, Pragna R, Ventakesh M. 2011. Study of the effect of Ampicillin Trihydrate on protein binding of Osetalmivir phosphate. *Der Pharmacia Lettre* 3(3): 320-324.
- Vree TB, Shimoda M, Driessen JJ, Guelen PJM, Janssen TJ, Termond EFS, Dalen R van, Hafkenscheid CM, Dirksen MSC. 1989. Decreased plasma albumin concentration results in increased volume of distribution and decreased elimination of midazolam in intensive care patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 46(5): 537-44.
- Walker DR, Dowling PM. 2006. Fluoroquinolones. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4th ed. Edited by Geguere S, Prescott JF, Baggot JD, Walker ED, Dowling PM. Blackwell Pub. 268.
- Zeitlinger MA, Saurmann E, Traunmuller F, Georgopoulos A, Muller M, Joukhadar C. 2004. Impact of plasma protein binding on antimicrobial activity using time-killing curves. *Journal of Antimicrobia Chemotherapy* 54: 876-880.
- Zini R, Riant P, Barre R Tillement JP. 1990. Disease-induced variations in plasma protein levels. Implication for drug dosage regimens (Part I). *Clinical Pharmacokinetics* 19(2): 145-59.