



Review: Analysis of Warfarin Drug Compounds in Blood Plasma with HPLC/KCKT Method

Review: Analisis Senyawa Obat Warfarin dalam Plasma Darah dengan Metode HPLC/KCKT

Siti Nafisa^{1*)}, Siti Rohmah¹⁾, Yumareta Anggun Nihan¹⁾, Lina Nurfadhila¹⁾, Marsah Rahmawati Utami¹⁾

¹Universitas Singaperbangsa Karawang, Jawa Barat, Indonesia
e-mail author: sitinafisaa@gmail.com

ABSTRACT

Warfarin is a synthetic derivative of coumarin whose use as an oral anticoagulant generally used to prevent and treat blood clots, prophylaxis also the treatment of pulmonary embolism, and thrombosis of venous, prophylaxis and treatment prophylaxis of thromboembolic complications from atrial fibrillation or replacement of heart valve, and the risk of death from recurrent myocardial infarction, and thromboembolic events after myocardial infarction can be reduced. Warfarin is a narrow therapeutic index of oral anticoagulants where if there is a slight change in the level of warfarin in the blood, a change in the effective response can occur. Many analytical techniques have been developed for the analysis of warfarin levels in blood plasma, for example using High-Performance Liquid Chromatography coupled with ultraviolet/fluorescence detection, SFC-MS/MS, LC-MS/MS, CZE with ultraviolet detection, and MEKC-ESI-MS. The test method used for monitoring this Review Article has the purpose of reviewing and comparing analytical methods/detection techniques used for the analysis of warfarin in blood plasma. The HPLC method has several advantages in the analysis of warfarin drug levels, such as ease, accuracy, effectiveness of analysis time, and advantages of high sensitivity and selectivity.

Keywords: Warfarin; Blood Plasma; HPLC; Chromatography

ABSTRAK

Warfarin merupakan turunan sintetik kumarin yang penggunaannya sebagai antikoagulan oral yang biasa digunakan untuk mencegah dan mengobati penggumpalan darah, profilaksis dan pengobatan emboli paru dan trombosis vena, profilaksis dan pengobatan komplikasi tromboemboli dari fibrilasi atrium atau penggantian katup jantung, serta risiko kematian dari infark miokard berulang, dan kejadian tromboemboli setelah infark miokard dapat di kurangi. Warfarin merupakan indeks terapi sempit antikoagulan oral yang apabila adanya perubahan sedikit kadar obat warfarin pada darah maka dapat terjadi perubahan respons efek. telah banyak dikembangkan berbagai teknik analitik bagi analisis kadar warfarin yang ada dalam plasma darah, contohnya seperti menggunakan High-Performance Liquid Chromatography ditambah dengan deteksi ultraviolet/ fluoresensi, SFC-MS/MS, LC-MS/MS, CZE dengan deteksi ultraviolet, dan MEKC-ESI-MS.

Metode uji yang digunakan untuk pemantauan Artikel Review ini memiliki tujuan sebagai tinjauan dan perbandingan metode analisis/ teknik pendeteksian yang digunakan pada analisis warfarin yang ada dalam plasma darah. Metode HPLC memiliki beberapa keuntungan dalam analisis kadar obat warfarin, yaitu seperti kemudahan, keakuratan, efektifitas waktu analisa, serta keunggulan sensitivitas dan selektivitas yang tinggi.

Kata kunci: Warfarin; Plasma Darah; HPLC; Kromatografi

PENDAHULUAN

Warfarin merupakan turunan sintetik kumarin (4-OH coumarin), penggunaannya paling banyak sebagai obat antikoagulan oral dalam pencegahan serta pengobatan proses tromboemboli pada manusia seperti tromboemboli vena dan tromboemboli arteri (Ranjbar bandforuzi & Hadjmohammadi, 2017, p. 1). Warfarin banyak disebut sebagai "pengencer darah" akan tetapi warfarin tidak mempengaruhi kekentalan/viskositas darah. Pada hati warfarin bekerja dengan menyebabkan pengurangan jumlah protein kunci pada darah yang dapat memungkinkan menggumpalnya darah (Oktaviani et al., 2020). Secara kompetitif (VKORC1) atau Vitamin K Epoxide Reductase Complex 1 dihambat oleh warfarin, dimana VKORC1 adalah enzim yang penting dalam pengaktifan vitamin K dalam tubuh. Warfarin dapat mengurangi sintesis faktor pembekuan aktif dengan cara menghabiskan cadangan vitamin K fungsional (Patel et al., 2023). Selain digunakan untuk antikoagulan oral yang biasa digunakan mencegah dan mengobati penggumpalan darah, warfarin juga digunakan sebagai profilaksis dan pengobatan trombosis vena dan timbul emboli paru (Doliner et al., 2019; Alexander et al., 2021), pengobatan dan profilaksis komplikasi tromboemboli dari fibrilasi atrium atau penggantian katup jantung (Doliner et al., 2019), serta risiko kematian dari infark miokard berulang, dan kejadian tromboemboli (misalnya, stroke, embolisasi sistemik) setelah infark miokard dapat dikurangi (Sharp et al., 2019).

Warfarin merupakan indeks terapi sempit antikoagulan oral (Fauzy et al., 2020, p. 157). Hal tersebut mengartikan bahwa penggunaan warfarin membutuhkan perhatian lebih karena apabila adanya perubahan sedikit kadar obat warfarin pada darah maka dapat terjadi perubahan respons efek, selain itu adanya

interaksi warfarin dengan obat-obatan lain, alkohol, dan makanan bisa terjadi perubahan kadar warfarin pada plasma darah menjadi berkurang ataupun bertambah, yang mengakibatkan penggunaan warfarin menjadi tidak aman ataupun tidak efektif (Sholihah et al., 2021, p. 128). Sebab itu, pemantauan keberhasilan terapi warfarin untuk setiap pasien diperlukan. Pemantauan terapeutik warfarin umumnya dilakukan dengan metode *International Normalized Ratio* (INR). Metode INR ini membatasi deteksi parameter seperti variasi makanan, kepatuhan pasien, serta resistensi terhadap antikoagulan yang dapat mempengaruhi efek antikoagulan (Majidi & Hadjmohammadi, 2020). Setelah penggunaan warfarin nilai INR yang direkomendasikan yaitu sekitar 2-3. Efek antikoagulan warfarin berlebihan apabila hasil nilai INR tinggi, sehingga dapat terjadi efek samping perdarahan, maka dari itu dibutuhkan dengan tepat regimen dosis warfarin sehingga tidak dapat menimbulkan terjadinya efek samping yaitu pendarahan ataupun sebaliknya tromboembolisme. Pemberian dosis dan efek interaksi warfarin yang diamati (dengan obat-obatan lain, alkohol, makanan) bisa diketahui dengan cara analisis konsentrasi warfarin yang ada pada plasma darah (Alnaqeeb et al., 2019). Warfarin terabsorpsi sempurna melalui oral pada 4 jam puncak plasma, dan terdistribusi kecil (0,4 l/kg) pada pemberian Intra Vena maupun Intra Muscular, 99% terikat protein plasma. Metabolisme warfarin secara aktif dilakukan oleh enzim sitokrom P-450, lalu akan dieliminasi oleh metabolisme hepar, kemudian tereksresikan di urin dan feses (Alaydrus et al., 2015).

Berbagai teknik analitik banyak dikembangkan untuk melakukan analisis warfarin di dalam plasma darah, seperti menggunakan HPLC ditambah deteksi fluoresensi atau ultraviolet, SFC-MS/MS, LC-MS/MS, CZE dengan

deteksi ultraviolet, dan MEKC-ESI-MS (Majidi & Hadjmohammadi, 2020). Namun, metode uji yang digunakan untuk pemantauan konsentrasi obat haruslah cepat, sederhana, menggunakan instrumentasi yang murah dan mudah digunakan, serta mempunyai selektivitas serta sensitivitas yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan metode dan detektor lain. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) adalah suatu metode analisis kualitatif, kuantitatif, pemisahan/ isolasi dan pemurnian. HPLC merupakan metode kromatografi kolom yang bekerja dengan melewati molekul analit melalui celah berpori fase diam, sehingga memisahkan analit sesuai dengan polaritasnya. Pada HPLC, tekanan tinggi digunakan untuk memindahkan fase gerak ke kolom sehingga laju dan efisiensi pemisahan akan lebih efisien (Angraini & Desmaniar, 2020, p. 69). Artikel Review ini bertujuan memberikan tinjauan dan perbandingan terkait metode preparasi sampel maupun teknik pendeteksian yang biasa digunakan pada analisis warfarin dalam plasma darah.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam menulis artikel review ini yaitu diawali dengan pengumpulan beberapa jurnal yang akan di review. Pencarian sumber untuk artikel review ini menggunakan media online *Google Scholar* dengan cara mencari beberapa jurnal terakreditasi dengan tahun terbit 2012 hingga 2023. Kata kunci yang digunakan dalam pencarian menggunakan kata kunci "Analisis Warfarin", "Plasma Darah", "Metode HPLC/KCKT". Hasil yang didapat adalah sebanyak 434 jurnal dan hanya 30 jurnal yang relevan dan beberapa literatur lainnya sebagai literatur pendukung. Jurnal-jurnal tersebut kemudian dilakukan skrining berdasarkan judul dan abstrak agar sesuai dengan pembahasan yang akan digunakan.

HASIL DAN DISKUSI

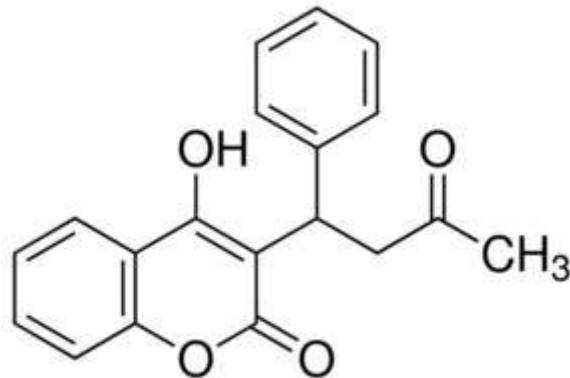
Warfarin atau (3- α -phenylpropanone-4-hydroxycoumarin) adalah obat pengencer darah atau antikoagulan. Antikoagulan bekerja dengan mengurangi aksi faktor pembekuan darah untuk mencegah pembekuan darah. Warfarin dipasarkan secara komersial sebagai kombinasi rasemat. Warfarin tersedia sebagai kombinasi rasemat yang diperoleh dua enantiomer, yaitu R-Warfarin dan S-

Warfarin. Warfarin adalah turunan rodentisida dan kumarin (4-OH kumarin) generasi pertama. Warfarin telah banyak digunakan sebagai obat antikoagulan oral dalam pencegahan dan pengobatan proses tromboemboli pada manusia sejak tahun 1950-an, termasuk tromboemboli vena dan arteri, emboli paru, katup jantung, fibrilasi atrium, menghindari risiko infark miokard yang berulang, dan kematian tromboemboli setelah infark miokard. Dampak antikoagulan Warfarin disebabkan oleh penekanan produksi faktor koagulasi yang bergantung pada vitamin K (Bandforuzi et al., 2017; Majidi et al., 2020).

Mekanisme antikoagulan bekerja dengan mencegah interkonversi siklik vitamin K dan epoksida. Warfarin memiliki bioavailabilitas tinggi, yang berarti cepat diserap dari sistem pencernaan manusia dan mencapai konsentrasi puncak (C Max) 90 menit setelah pemberian oral. Warfarin memiliki afinitas tinggi ($K_d = 3,4 \times 10^{-7}$ M) untuk berikatan dengan protein plasma (albumin) dan terakumulasi di hati agar jumlah protein terbatas dalam darah penyebab penggumpalan. Sitokrom P450s (CYP) mengubahnya menjadi senyawa tidak aktif yang dieliminasi dalam urin (Ye H et al., 2019). Oleh reduktase keton menjadi alkohol warfarin (RR/SS- dan RS/SR-warfarin alkohol). Metabolit ini menunjukkan aktivitas antikoagulan yang terbatas, memiliki (IC₅₀) 12,5 mM, yang enam kali lebih rendah dari warfarin (Lomonaco et al., 2018).

Warfarin memiliki indeks terapeutik yang terbatas, konsentrasinya harus dipantau dengan menganalisis dampak farmakologisnya pada *International Normalized Ratio* (INR). INR digunakan untuk melacak karakteristik koagulasi warfarin. Terdapat kekurangan INR dalam pendeteksian variabel-variabel, antara lain kepatuhan pasien, interaksi obat, resistensi antikoagulan, dan perubahan pola makan. Terlepas dari kenyataan bahwa INR diakui secara luas sebagai tolok ukur untuk memantau pengobatan antikoagulan dan perubahan dosis. Setelah mengkonsumsi warfarin, nilai INR yang optimal adalah 2-3. Pemantauan INR yang tidak memadai dapat menimbulkan konsekuensi serius; *Under Anticoagulation* predisposisi pasien untuk trombosis, sedangkan *Over Anticoagulation* risiko peningkatan perdarahan. Menganalisis kandungan warfarin dalam plasma darah memungkinkan penentuan dosis dan pemantauan efek warfarin

berinteraksi dengan obat dan herba (Fauzy et al., 2020)



Gambar 1. Struktrur Kimia Warfarin

Tabel 1. Analisis Senyawa Obat Warfarin dalam Plasma Darah dengan Metode HPLC/KCKT

No.	Analit	Matriks	Metode	Sistem	LLOQ	Pustaka
1.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> Fase Gerak: Asamfosfat (0,5%) 35mL dan metanol 65mL Jenis Kolom: C18 Elusi: isokratik Laju alir: 1mL/min Detektor: UV/Vis <i>Dual Wavelength Absorbance Detector</i> 	1	(Bandforuzi et al., 2017)
2.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> Fase gerak: (75:25:0,5)heksana:2-propanol:asam asetat glasial Kolom: Kolom kiral [R,R]WHELK-01 Elusi: Sistem isokratik Laju alir: 1mL/min Detektor: UV 313 nm 	5 (R-Warfarin) 10 (R-Warfarin)	(Zambon et al., 2018)

3.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: asetonitril : air (80:20) • Kolom: C18 • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 1mL/min • Detektor: UV/Vis <i>dual wavelength absorbance Detector</i> 	8,91	(Majidi et al., 2020)
4.	Warfarin	Plasma Tikus (<i>Rat Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: Na₂HPO₄ 40% : asetonitril 60% • Kolom: C18 • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 1 mL/min • Detektor: UV 308 nm 	Tidak Disebutkan	(Ye, H et al., 2019).
5.	Warfarin	Plasma Tikus (<i>Rat Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: asetonitril air 60%:40% yang mengandung 1 mL trietanolamin dan asam fosfat • Kolom: hypersil TM BDS C18 • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 1mL/min • Detektor: UV 310 nm 	Tidak Disebutkan	(Alnaqeeb et al., 2019)
6.	Warfarin	Plasma Tikus (<i>Rat Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: (500:500:2) asetonitril : air : asam format 88% • Kolom: C8 • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 0,8 mL/min • Detektor: UV 305 nm 	Tidak Disebutkan	(Ueng et al., 2017)
7.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: 2 mM NH₄COOH dalam air: NH₄COOH 2 mM dalam 90/10 CH₃CN/H₂O • Kolom: Chiralcel OD-3R • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 0,02 mL/min • Detektor: UV 280 nm 	Tidak Disebutkan	(Kobayashi et al., 2019)
8.	Warfarin	Plasma Anjing (<i>Dog Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: metanol : asam format : isopropanol (90:0,5:10) • Kolom: Lux cellulose-3 chiral • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 1 mL/min • Detektor: UV 288 nm 	Tidak Disebutkan	(Shen et al., 2016)

9.	Warfarin	Plasma Tikus (<i>Rat Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: acetonitrile:buffer fosfat:methanol (10:70:20) • Kolom: diphenyl • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 0,8 mL/min • Detektor: Fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 310 nm dan emisi 390 nm) 	10	(Lomonaco et al., 2013)
10.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak:buffer fosfat pH 7 70% dan metanol 30% • Kolom: Poroshell EC-C-18 <i>reversed-phase</i> • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 0,7 mL/min • Detektor: Fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 310 nm dan emisi 390 nm) 	1,3	(Lomonaco et al., 2018)
11.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: 0,1% H₃PO₄ dalam H₂O:CH₃CN (ramp dari 80:20 hingga 65:35 dalam 2,5 menit, lalu ramp pada 5:95). • Kolom: 6 kolom: 3,0 mm x 100mm 3.0 mm, 2.7 m Poroshell dan Ascentis Express. • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 0,75 mL/min • Detektor: UV 210 nm 	Tidak Disebutkan	(Regalado et al., 2014)
12.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: eluen A (0.1 vol% formic acid dalam deionized H₂O) dan eluent B (0.1 vol% <i>formic acid</i> dalam MeCN). • Kolom: Waters X Bridge C18 dengan prekolom C18 universal • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 1.0 mL/min • Detektor: <i>precursor</i> 306.90, <i>fragment</i> 161.10, <i>impact</i> 17.0 	2	(Rodina et al., 2022)

13.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: larutan buffer potassium dihydrogen orthophosphate pada pH 6,5 (30:70) • Kolom: Purospher STAR RP-18e • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 1.0 mL/min • Detektor: <i>photodiode array detector</i> 	Tidak Disebutkan	(Chua et al., 2019)
14.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: Triethylamine:asetonitril:asam asetat glasial (2,5:1000: 3). • Kolom: LiChroCART® 250-4 ChiraDex® kolom panjang dengan kolom LiChroCART® 4-4 ChiraDex® • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 1.0 mL/min • Detektor: fluoresensi diatur panjang gelombang eksitasi 300 nm dan panjang gelombang emisi 390 nm. 	12,5	(Qayyum et al., 2015)
15.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: metanol dan (0.5 %) larutan <i>phosphoric acid</i> (80:20 v/v) • Kolom: C18. • Elusi: gradien • Laju alir: 1.0 mL/min • Detektor: UV 320 nm 	14,5	(Peyrovi et al., 2015)
16.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: 0,5% asam fosforik dan metanol (65:35) • Kolom: C18 • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 1.0 mL/min • Detektor: UV model LC-95. 	Tidak Disebutkan	(Ghambari et al., 2012)
17.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: MeOH:AN:buffer asam asetat (20;40;40%) • Kolom: Analitik Chiral AGP • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 0.9 mL/min • Detektor: UV 274 nm 	15,4	(Ahmadi et al., 2015)

18.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Rat Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: Buffer fosfat:metanol:asetonitril (70:20:10) • Kolom: Fortis reversed-phase diphenyl • Elusi: Sistem Gradien • Laju alir: 0.8 mL/min • Detektor: <i>fluorescence detection</i> 	0,01	(Zayed et al., 2020)
19.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: campuran acetonitrile dan Buffer 0.02 mol L⁻¹ (pH diatur hingga 2,5 menggunakan asam fosforic ortho) 10:90 dengan tambahan 1% TEA. • Kolom: Astec Chirobiotic V • Elusi: Sistem Gradien • Laju alir: 1 mL.min • Detektor: UV 254 nm 	0.05, 0.25, dan 0.1	(Abdallah N, 2014)
20.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: metanol dan <i>phosphoric acid</i> 0.5% (80:20) • Kolom: C18 • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 1 mL/min • Detektor: UV LC-95 	0.0165	(Peyrovi et al., 2015)
21.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: (40:60) isopropanol dan potasium posfat • Kolom: C18 • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 1 mL/min • Detektor: UV-VIS detector dan 100 ml loop injeksi. 	Tidak Disebutkan	(Kumar et al., 2013)
22.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: asetonitril: asam metanoik 0,5% • Kolom: Inertsil ODS-3 column (150 × 4.6mm, 5 μm; GL Sciences Inc, Tokyo, Japan) • Elusi: Sistem Isokratik • Laju alir: 0,8mL/min • Detektor: L998A Fluorescence Detector (Xian Tianlong Technology company, Xian, Shaanxi, China) 	5	(Li W et al., 2018)

23.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: 30:70 (v/v) kombinasi dari MeOH dan KH₂PO (0.01 M) • Kolom: Purospher® STAR kolom endcapped RP-18 dipasangkan dengan guard cartridge (Purospher® STAR; 4 × 4 mm i.d., 5 µm). • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 0,75 mL/min • Detektor: Waters 2996 PDA 190-800 nm. 	Tidak Disebutkan	(Chua et al., 2012)
24.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: metanol/asetonitril/air (50/10/40, v/v) dengan asam asetat glasial 0,1%. • Kolom: kiral tipe Pirkle (R,R) Whelk-O1 • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 1 mL/min • Detektor: Waters 996 <i>photodiode array detector</i> (Waters corp., Milford, MA, USA) 	160	(Osman et al., 2005)
25.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: campuran metanol dan asam fosforik 0,5% • Kolom: C18 • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 0,75 mL/min • Detektor: UV model detektor LC-95 254nm dan injektor manual model 7125i dengan 20 µm sample loop . 	Tidak Disebutkan	(Hadjmohammadi et al., 2012)
26.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: 30% metanol dan 70% penyangga posfat 25 mM pada pH 7 • Kolom: C-18 <i>reversed-phase column</i> Poroshell EC-C18 disambung <i>guard column</i> TC-C18 • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 0,7 mL/min • Detektor: 310 nm <i>fluorescence detector</i> (FP 2020), dan 390 nm pada ultraviolet detector (UV 2070). 	0.3, 0.5, 0.6	(Lomonaco et al., 2014)

27.	Warfarin	Plasma Tikus (<i>Rat Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: eluen A (0.01% asam format dalam air), dan eluen B (Asetonitril 99% dalam asam format 0.01% encer). • Kolom: EcoNova ProntoSil-120-3-C18 Kolom analitik (EcoNova, Russia), dengan kolom Zorbax Eclipse XBD-C18 • Elusi: Sistem gradien • Laju alir: 200-400 mL/min • Detektor: <i>diode array detectors</i> (G1315B) 	10	(Chernonosov et al., 2016)
28.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: Asetonitril 35% dan 10mM peyangga posfat 65% • Kolom: C18 dengan filter pre-kolom • Elusi: Sistem isokratik • Laju alir: 1 mL/min • Detektor: UV 220nm 	Tidak Disebutkan	(Mullokov et al., 2014)
29.	Warfarin	Plasma Manusia (<i>Human Blood</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: metanol dengan 50 mM penyangga posfat pH 7.0 (40:60 v/v) yang telah difiltrasi dengan 0.2 μm <i>cellulose acetate</i> membrane filter dan disonikasi sebelum digunakan • Kolom: CTO-10AS vp column oven • Elusi: sistem isokratik • Laju alir: 1,1 mL/min • Detektor: RF-10AXL <i>Spectrofluorometric detector</i> 	42	(Sornsuvit et al., 2015)
30.	Warfarin	Plasma Tikus (<i>Rat Plasma</i>)	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Fase gerak: air dan asetonitril 45% (55%, dalam 0.1% asam asetat) • Kolom: C18 dengan kolom Phenomenex Security Guard • Elusi: sistem isokratik • Laju alir: 1 mL/min • Detektor: DAD detector 308nm 	Tidak Disebutkan	(Nosál et al., 2020)

Fase gerak mengelusi sampel melalui fase diam hingga terdeteksi. Puncak kromatogram dipengaruhi oleh penentuan fase gerak. Kepolaran Fase gerak lebih tinggi dibandingkan fase diam dalam sistem HPLC fase terbalik. Nilai pH dan pKa senyawa signifikan dalam fase gerak karena mempengaruhi periode analit retensi dan puncak yang terbentuk pada hasil kromatogram. Penambahan fase gerak organik, buffer, pH, dan *modifier* fase gerak dapat berdampak pada bentuk puncak pada kromatogram. Asetonitril dan metanol digunakan sebagai *modifier* fase gerak organik dimaksudkan bentuk puncak mengalami peningkatan. Derajat ionisasi analit dan afinitas analit dipengaruhi pH dan nilai pKa suatu senyawa terhadap fase gerak dan fase diam.

Pada artikel review ini, percobaan atas fase gerak warfarin telah banyak dibuat secara asam menggunakan penambahan larutan penyangga (Bandforuzi et al., 2017; Alnaqeeb et al., 2019; Lomonaco et al., 2018; Lomonaco et al., 2013; Chua et al., 2019; Ahmadi et al., 2015; Zayed et al., 2020; Abadallah, 2014; Kumar et al., 2013; Lomonaco et al., 2014; Mullokandov et al., 2014; Sornsuvit et al., 2015) atau asam format (Rodina et al., 2022; Li et al., 2018). Hal ini memungkinkan warfarin ada dalam keadaan tidak terionisasi, menyebabkan warfarin teradsorpsi secara non polar pada fase diam yang digunakan, memungkinkan resolusi tinggi dari puncak yang terbentuk (Sholihah S, et.al., 2021). Asetonitril adalah fase gerak pelarut non-polar, sedangkan air pelarut yang bersifat polar (Bandforuzi et al., 2017; Alnaqeeb et al., 2019; Ye et al., 2019; Ueng et al., 2017; Lomonaco et al., 2013; Qayyum et al., 2015; Zayyed et al., 2020; Abdallah, 2014; Li et al., 2018; Osman et al., 2005; Chernonosov, 2016; Mullokandov et al., 2014; Nosal et al., 2020). Asetonitril adalah fase gerak polar-aprotik yang sering dipergunakan dalam metode dengan HPLC dikarenakan memiliki banyak keuntungan, termasuk absorbansi di wilayah panjang gelombang rendah sinar UV sehingga absorbansi sampel tidak terganggu, menghasilkan *noise* rendah dan bentuk puncak baik pada kolom C18 (Savitri, I. et al., 2017). Fase gerak metanol yang digunakan antara lain pada (Bandforuzi et al., 2017; Lomonaco et al., 2018; Shen et al., 2016; Lomonaco et al., 2013; Peyrovi et al., 2015; Ghambari, 2012; Zayed et al., 2020; Peyrovi et al., 2015; Osman et al., 2005; Hadjmohammadi et al., 2012; Lomonaco et al., 2014; Mullokandov et al.,

2014). Polar-protik adalah sifat pelarut metanol, bekerja kurang baik jika disandingkan dengan asetonitril, namun harga yang lebih murah. Jika dibandingkan dengan asetonitril, metanol terdapat kekurangan yakni besarnya nilai batas UV, kekuatan elusi yang kecil, dan viskositas yang meningkat jika digabungkan dengan air (Ueng YF et al., 2017).

Kolom C18 dan C8 sering digunakan dalam pengujian warfarin. Dalam review artikel ini, kolom C18 digunakan lebih banyak daripada kolom lainnya, dengan 15 studi menggunakannya, 2 studi menggunakan kolom C8, 6 studi menggunakan kolom kiral, 2 studi menggunakan kolom difenil, dan 1 studi masing-masing menggunakan Purospher STAR RP-18e, Kolom Astec Chirobiotic V, kolom Inertsil ODS-3, dan kolom oven CTO-10AS vp. Permasalahannya yakni warfarin yang bersifat semi-polar. Rantai alkil yang lebih panjang memisahkan senyawa non-polar dengan lebih baik, sedangkan rantai alkil yang lebih pendek memisahkan molekul polar dengan lebih baik. Kolom C18 memiliki luas permukaan yang lebih besar untuk berinteraksi dengan analit dan lebih terhalang pada permukaan silika dibandingkan kolom lain. Kolom tipe kiral dapat membedakan senyawa dua enantiomer karena diidentifikasi sebagai satu molekul dalam HPLC dan memperoleh puncak dengan periode retensi berbeda. Penggunaan kolom tipe kiral menyebabkan warfarin terpisah menjadi R-warfarin dan S-warfarin (Ding, T. et al., 2015).

Terdapat dua jenis sistem elusi kromatografi yakni gradien dan isokratik. Elusi isokratik adalah kekuatan fase gerak tetap sama dari awal hingga akhir dalam sistem elusi (rasio jumlah perubahan fase gerak). Elusi gradien adalah kekuatan fase gerak bervariasi dari awal hingga akhir dalam sistem elusi (rasio jumlah perubahan fase gerak). Teknik gradien biasanya untuk pemisahan sejumlah besar senyawa kimia dari sampel. Sistem elusi isokratik lebih umum digunakan dalam artikel review ini daripada teknik elusi gradien. Dalam 16 penelitian, terdapat teknik elusi isokratik yang digunakan, sedangkan dalam 14 penelitian, sistem elusi gradien yang digunakan. Biasanya, teknik elusi isokratik memberikan resolusi superior. Beberapa investigasi telah menyebutkan bahwa teknik gradien memberikan keuntungan disandingkan dengan isokratik, diantaranya waktu yang lebih cepat dalam menganalisis sampel.

Keadaan kromatografi yang harus diperhatikan salah satunya adalah laju alir. Laju aliran adalah laju aliran melalui fase diam (Mirmanto et al., 2018). Dalam proses optimalisasi metode HPLC penentuan debit aliran termasuk ke dalamnya sehingga sebelum analisis perlu dilakukan. Pemisahan yang tidak ideal atau sempurna dihasilkan dari laju aliran yang terlalu cepat atau terlalu lambat. Laju aliran berkisar dari 0,01 hingga 1 mL/menit.

Selama deteksi sampel, memerlukan detektor yang terkoneksi ke HPLC. Untuk penentuan warfarin, detektor yang biasa dipakai adalah UV, FLD, dan MS. Detektor yang biasa dipakai dalam analisis HPLC adalah detektor UV, tetapi jika dipakai untuk mendeteksi sejumlah kecil analit detektor ini kurang sensitif (Susanti et al., 2019). Dalam ulasan ini, sebanyak 14 artikel menggunakan detektor UV (Alnaqeeb et al., 2019; Angraini & Desmaniar, 2020, p. 69; Fauzy et al., 2020; Zambon et al., 2018; Ueng et al., 2017; Kobayashi et al., 2019; Lomonaco et al., 2013; Qayyum et al., 2015; Peyrovi et al., 2015; Ghambari et al., 2012; Zayed et al., 2020; Osman et al., 2005; Hadjmohammadi et al., 2012; Chernonosov et al., 2016), dan panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk deteksi warfarin berbeda, 210 nm (Lomonaco et al., 2013), 220 nm (Chernonosov et al., 2016), 254 nm (Zayed et al., 2020; Osman et al., 2005), 274 nm (Ghambari et al., 2012), 280 nm (Ueng et al., 2017), 288 nm (Kobayashi et al., 2019), 305 nm (Zambon et al., 2018), 308 nm (Angraini & Desmaniar, 2020, p. 69), 310 nm (Alnaqeeb et al., 2019), 313 nm (Fauzy et al., 2020), 320 nm (Qayyum et al., 2015; Peyrovi et al., 2015), dan 390 nm (Hadjmohammadi et al., 2012). Kemudian sebanyak 2 artikel menggunakan detektor UV/Vis *dual wavelength absorbance* (Bandforuzi et al., 2017; Majidi et al., 2020). Substitusi atau perbedaan fase gerak akan menyebabkan perbedaan panjang gelombang. Pergeseran merah adalah pergeseran absorbansi menuju panjang gelombang yang makin panjang, sedangkan pergeseran kromatik adalah pergeseran absorbansi menuju panjang gelombang yang lebih pendek. Penggunaan fase gerak yang berbeda menyebabkan perbedaan panjang gelombang (Sastrohamidjojo, 2018). Metanol memiliki dampak pergeseran panjang gelombang yang minimum diantara fase gerak yang lainnya dalam metode warfarin dengan

menggunakan HPLC detektor UV ini. Dengan detektor ini, nilai LLOQ berkisar antara 1-10 ng/mL.

Sensibilitas dan selektivitas yang lebih dibandingkan dengan detektor UV merupakan keunggulan dari detektor fluoresensi. Dalam ulasan artikel ini, 6 artikel menggunakan detektor fluoresensi. Interaksi stereospesifik S- dan R-warfarin memerlukan kuantifikasi enansiomer warfarin untuk menentukan profil farmakokinetik warfarin. Metode validasi untuk analisis warfarin dalam plasma dikembangkan menggunakan HPLC/KCKT detector fluoresensi dengan kolom chiralcel OD-RH (4,6 x 150 mm i.d., 5mm) dengan guard column Chiralcel OD-RH (4,0 x 10mm, 5mm), seperti yang dilakukan oleh Putriana et al., (2022). Pemisahan isokratik dilakukan dengan menggunakan fase gerak asetonitril:dapar fosfat pH 2,00, rasio 40:60 v/v, suhu kolom 40°C, laju alir 1 ml/menit, volume injeksi 50 ml (Putriana et al., 2022). Diukur pada panjang 310 nm dan 390 nm digunakan untuk mendeteksi warfarin dalam penelitian (Ye, H et al., 2019; Shen et al., 2016; Chua et al., 2019; Ahmadi et al., 2015; Kumar et al., 2013; Hadjmohammadi et al., 2012). Nilai LLOQ untuk HPLC dengan detektor fluoresensi berkisar antara 1,3-10 ng/mL. Spesifisitas dan selektivitas yang tinggi, serta dapat menganalisis sejumlah besar sampel dalam waktu singkat dimiliki oleh detektor spektrometri massa. Kerugiannya adalah biaya yang dibutuhkan, membutuhkan alat yang rumit dan menggunakan alat pendeteksi yang cukup mahal. Namun, detektor ini sangat umum dalam metode kromatografi modern (Rohayati et al., 2015).

KESIMPULAN

Metode analisis yang umum dipakai untuk penentuan warfarin secara kuantitatif adalah metode HPLC dengan deteksi spektrometri massa. Metode ini juga memiliki keunggulan sensibilitas dan selektivitas yang tinggi dibandingkan dengan metode dan detektor lain karena memiliki batas kuantifikasi terendah yaitu 0,014 ng/mL. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril dan kolom C18 digunakan. Juga untuk sistem elusi, gradien menawarkan lebih banyak keuntungan meskipun sistem elusi isokratik lebih banyak digunakan. Metode termudah adalah menggunakan asetonitril sebagai presipitasi protein untuk presipitasi protein, menambahkan asam untuk meningkatkan pemulihan.

REFERENSI

- Abdallah, N. A. (2014). HPLC and densitometric TLC methods for simultaneous determination of gemifloxacin with some co-administered drugs in human plasma. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 5(2), 1.
- Ahmadi, F., Yawari, E., & Nikbakht, M. (2015). Computational design of an enantioselective molecular imprinted polymer for the solid phase extraction of S-warfarin from plasma. *J of Chromatography A*, 1338, 9-16.
- Alaydrus, H., Suharto, G., & Amarwati, S. (2015). Analisa Gambaran Post Mortem Makroskopis Dan Mikroskopis Otak Dan Hati Pada Tikus Wistar Setelah Pemberian Warfarin Ld-50 Dan Ld-100. *Diponegoro University*.
- Alexander, P., Visagan, S., Issa, R., Gorantla, V. R., & Thomas, S. E. (2021). Current Trends in the Duration of Anticoagulant Therapy for Venous Thromboembolism: A Systematic Review. *Cureus*, 13(10), e18992. <https://doi.org/10.7759/cureus.18992>
- Alnaqeeb, M., Mansor, K. A., Mallah, E. M., Ghanim, B. Y., Idkaidek, N., & Qinna, N. A. (2019). Critical pharmacokinetic and pharmacodynamic drug-herb interactions in rats between warfarin and pomegranate peel or guava leaves extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2436-5>
- Angraini, N., & Desmaniar, P. (2020). Optimasi penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) untuk analisis asam askorbat guna menunjang kegiatan Praktikum Bioteknologi Kelautan. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), 69. <https://doi.org/10.56064/jps.v22i2.583>
- Bandforuzi SR, Hadjmohammadi MR. (2017). Solvent bar microextraction using a reverse micelle containing extraction phase for the determination of warfarin from human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1496, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.037>.
- Chernonosov, A. (2016). Quantification of warfarin in dried rat plasma spots by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutics*.
- Chua, Y. A., Abdullah, W. Z., & Gan, S. H. (2012). Development of a high-performance liquid chromatography method for warfarin detection in human plasma. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(5), 930-941.
- Chua, Y. A., Abdullah, W. Z., Yusof, Z., & Gan, S. H. (2019). Validation of HPLC and liquid-liquid extraction methods for warfarin detection in human plasma and its application to a pharmacokinetics study. *ASM Science J*, 12, 1-10.
- Ding, T., Zhang, Y., Chen, A., Tang, Y., Liu, M., & Wang, X. (2015). Effects of cucurbitacin E, a tetracyclic triterpene compound from Cucurbitaceae, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(5), 385-389.
- Doliner, B., Jaller, J. A., Lopez, A. J., & Lev-Tov, H. (2019). Treatments to prevent primary venous ulceration after deep venous thrombosis. *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders*, 7(2), 260-271.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvsv.2018.12.009>
- Fauzy, M. R., Sinuraya, R. K., & Putriana, N. A. (2020). Instrumen Monitoring Pasien Dalam Terapi Warfarin. *Majalah Farmasetika*, 5(4), 156–166. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v5i4.27821>
- Fauzy, M. R., & Susilawati, Y. (2020). Metode Analisa Warfarin. *Farmaka*, 18(1), 119-128.
- Ghambari, H., & Hadjmohammadi, M. (2012). Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma. *J of Chromatography B*, 899, 66-71.

- Hadjmohammadi, M., & Ghambari, H. (2012). Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 61, 44-49.
- Kobayashi, S., Ishii, K., Yamada, Y., Ryu, E., Hashizume, J., Nose, S., ... & Ohyama, K. (2019). Combination index of the concentration and in vivo antagonism activity of racemic warfarin and its metabolites to assess individual drug responses. *J of Thrombosis and Thrombolysis*, 47, 467-472.
- Kumar, D. K., Shewade, D. G., Parasuraman, S., Rajan, S., Balachander, J., Chandran, B. S., & Adithan, C. (2013). Estimation of plasma levels of warfarin and 7-hydroxy warfarin by high performance liquid chromatography in patients receiving warfarin therapy. *Journal of Young Pharmacists*, 5(1), 13-17.
- Li, W., Bu, F., Li, R., Wang, B., Shaikh, A. S., Zhang, Y., ... & Zhang, R. (2018). Bioequivalence Study of Warfarin in Healthy Chinese Volunteers With a Validated High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 7(3), 256-262.
- Lomonaco, T., Ghimenti, S., Piga, I., Onor, M., Melai, B., Fuoco, R., & Di Francesco, F. (2013). Determination of total and unbound warfarin and warfarin alcohols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J of Chromatography A*, 1314, 54-62.
- Lomonaco, T., Ghimenti, S., Piga, I., Biagini, D., Onor, M., Fuoco, R., & Di Francesco, F. (2014). Influence of sampling on the determination of warfarin and warfarin alcohols in oral fluid. *PloS one*, 9(12), 114430.
- Lomonaco, T., Ghimenti, S., Piga, I., Biagini, D., Onor, M., Fuoco, R., ... & Di Francesco, F. (2018). Monitoring of warfarin therapy: Preliminary results from a longitudinal pilot study. *J Microchemical*, 136, 170-176.
- Majidi, S. M., & Hadjmohammadi, M. R. (2020). Hydrophobic borneol-based natural deep eutectic solvents as a green extraction media for air-assisted liquid-liquid micro-extraction of warfarin in biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461030. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461030>
- Mirmanto, M., Sutanto, R., & Putra, D. K. (2018). Unjuk Kerja Kotak Pendingin Termoelektrik dengan Variasi Laju Aliran Massa Air Pendingin. *None*, 7(1), 44-49.
- Mullokov, E., Ahn, J., Szalkiewicz, A., & Babayeva, M. 2014. Protein binding drug-drug interaction between warfarin and tizoxanide in human plasma.
- Nosal, D. G., Feinstein, D. L., Chen, L., & van Breemen, R. B. (2020). Separation and quantification of superwarfarin rodenticide diastereomers brodifacoum, difenacoum, flocoumafen, brodifacoum, and difethialone in human plasma. *Journal of AOAC International*, 103(3), 770-778.
- Oktaviani, D. J., Widiyastuti, S., Maharani, D. A., Amalia, A. N., Ishak, A. M., & Zuhrotun, A. (2020). Farmaka Farmaka. *Farmaka*, 18(1), 1-15.
- Osman, A., Arbring, K., & Lindahl, T. L. (2005). A new high-performance liquid chromatographic method for determination of warfarin enantiomers. *Journal of Chromatography B*, 826(1-2), 75-80.
- Patel S, Singh R, Preuss C V, Patel N. 2023. Warfarin. In: StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470313/>.
- Peyrovi, M., & Hadjmohammadi, M. (2015). Synthesis of molecularly imprinted polypyrrole as an adsorbent for solid-phase extraction of warfarin from human plasma and urine. *Biomedical Chromatography*, 29(11), 1623-1628.
- Peyrovi, M., & Hadjmohammadi, M. (2015). Supramolecular solvent-based microextraction of warfarin from biological samples and its determination using HPLC. *J of the Iranian Chemical Society*, 12, 1253-1259.
- Putriana, N. A., Rusdiana, T., Rostinawati, T., Akbar, M. R., Saputri, F. A., & Utami, S.

- (2022). Validation of warfarin enantiomer analysis method in plasma using high-performance liquid chromatography fluorescence detector. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 13(1), 18–24. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_259_21
- Qayyum, A., Najmi, M. H., Khan, A. M., Abbas, M., Naveed, A. K., & Jameel, A. (2015). Determination of S-and R-warfarin enantiomers by using modified HPLC method. *Pakistan J of Pharma Scien*. 28(4).
- Ranjbar Bandforuzi, S., & Hadjmohammadi, M. R. (2017). Solvent bar microextraction using a reverse micelle containing extraction phase for the determination of warfarin from human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1496, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.037>
- Regalado, E. L., Schariter, J. A., & Welch, C. J. (2014). Investigation of two-dimensional high performance liquid chromatography approaches for reversed phase resolution of warfarin and hydroxywarfarin isomers. *J of Chroma*, 1363, 200-206.
- Rodina, T. A., Melnikov, E. S., Aksenov, A. A., Belkov, S. A., Sokolov, A. V., Prokofev, A. B., & Ramenskaya, G. V. (2022). Simultaneous Determination of Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban, and Warfarin in Human Blood Serum by HPLC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring. *Pharmaceutical Chemistry J*, 56(2), 289-293.
- Rohayati, A., Hasanah, A. N., Saptarini, N. M., & Aryanti, A. D. (2015). Optimasi kondisi pemisahan glibenklamid kombinasi metformin dalam plasma darah menggunakan KCKT. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2(3), 96.
- Sastrohamidjojo, H. 2018. Dasar-dasar spektroskopi. Yogyakarta: UGM Press.
- Savitri, I., Suhendra, L., & Wartini, N. M. (2017). Pengaruh jenis pelarut pada metode maserasi terhadap karakteristik ekstrak *Sargassum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 5(3), 93-101.
- Sharp, C. R., DeLaforcade, A. M., Koenigshof, A. M., Lynch, A. M., & Thomason, J. M. (2019). Consensus on the Rational Use of Antithrombotics in Veterinary Critical Care (CURATIVE): Domain 4-Refining and monitoring antithrombotic therapies. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex. : 2001)*, 29(1), 75–87. <https://doi.org/10.1111/vec.12794>
- Shen, C., Huang, X., Li, J., Zhang, P., Li, L., Zhang, W., & Tang, H. (2016). Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of aspirin with warfarin in beagle dogs. *Xenobiotica*, 46(6), 530-541.
- Sholihah, S., Putriana, N. A., & Pratiwi, R. (2021). Review Metode Analisis Warfarin dalam Plasma dengan Berbagai Instrumen. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(2), 128. <https://doi.org/10.25077/jsfk.8.2.128144.2021>
- Sornsuvit, C., Niamhun, N., Luengpiansamut, N. U. T. T. H. I. D. A., Sangsrijan, S., Niwatananum, W., Kaewvichit, S. A. Y. A. M., & Yotsawimonwat, S. (2015). Pharmacokinetics and bioequivalence studies of warfarin sodium 5 milligrams tablet in healthy Thai subjects. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 219-222.
- Susanti, H., Araaf, N. P. M., & Kusbandari, A. (2019). Perbandingan metode spektrofotometri UV dan HPLC pada penetapan kadar kafein dalam kopi. *Majalah Farmasetika*, 4, 28-33.
- Ueng, Y. F., Lu, C. K., Yang, S. H., Wang, H. J., & Huang, C. C. (2017). Potentiation of the anticoagulation effect of warfarin by the herbal remedy Shu-Jing-Hwo-Shiee-Tang in rats: The dosing regimen and pharmacokinetic interaction. *Drug metab and pharma*, 32(1), 85-91.
- Ueng YF, Lu CK, Yang SH, Wang HJ, Huang CC. (2017). Potentiation of the anticoagulation effect of warfarin by the herbal remedy Shu-JingHwo-Shiee-Tang in rats: The dosing regimen and

- pharmacokinetic interaction. *Drug Metab Pharmacokinet*, 32(1), 85–91.
- Ye, H., Sui, D., Liu, W., Yuan, Y., Ouyang, Z., & Wei, Y. (2019). Effects of CYP2C11 gene knockout on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. *Xenobiotica*, 49, 1478-1484.
- Zambon, C. F., Pengo, V., Moz, S., Bozzato, D., Fogar, P., Padoan, A., ... & Padrini, R. (2018). Pharmacokinetic and pharmacodynamic re-evaluation of a genetic-guided warfarin trial. *Europ J of Clin Pharma*, 74, 571-582.
- Zayed, A., Babaresh, W. M., Darweesh, R. S., & El-Elimat, T. (2020). Simultaneous determination of warfarin and 7-hydroxywarfarin in rat plasma by HPLC-FLD. *Acta Pharmaceutica*, 70(3), 343-357.