PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ISONIAZID-RIFAMPISIN DALAM OBAT ANTI-TUBERKULOSIS DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

SKRIPSI

Disusun oleh :

ARDI NUGROHO

06613238

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

DESEMBER 2011

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ISONIAZID-RIFAMPISIN DALAM OBAT ANTI-TUBERKULOSIS DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

SKRIPSI

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

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Disusun oleh :

ARDI NUGROHO

06613238

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
DESEMBER 2011

SKRIPSI

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ISONIAZID-RIFAMPISIN DALAM OBAT ANTI-TUBERKULOSIS DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Yang diajukan oleh

ARDI NUGROHO

06613238

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,	Pembimbing Pendamping,
M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt	Ari Wibowo, S.Farm., Apt

SKRIPSI

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ISONIAZID-RIFAMPISIN DALAM OBAT ANTI-TUBERKULOSIS DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Oleh :

ARDI NUGROHO

06613238

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 16 Desember 2011

M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt ( )

Ari Wibowo, S. Farm., Apt ( )

Dr. Noor Fitri, M.Si

Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt ( )

Mengetahui
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA YOGYAKARTA FAKULTAS MIPA

Yandi Syukri, M.Si., Apt.

PERNYATAAN

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

Yogyakarta, 16 Desember 2011
Penulis,

Ardi Nugroho

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Puji syukur senantiasa kita panjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan karunia dan hidayah-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul: "PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ISONIAZID-RIFAMPISIN DALAM OBAT ANTI-TUBERKULOSIS DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI".

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan, dorongan dan bantuan baik material dan spiritual dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt selaku Ketua Prodi Farmasi sekaligus dosen pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan dan arahan sampai selesainya makalah ini.
2. Bapak Ari Wibowo, S.Farm., Apt selaku dosen pendamping yang telah memberikan masukan dan pikiran terhadap laporan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Noor Fitri, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan pikiran terhadap laporan skripsi ini.
4. Bapak Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan pikiran terhadap laporan skripsi ini.
5. Bapak Yandi Syukri, M.Si., Apt selaku Dekan Fakultas MIPA atas segala dukungan terhadap laporan skripsi ini.
6. Bapak Rektor Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyusun laporan skripsi.
7. Semua pihak yang telah membantu baik materiil dan spiritual dalam penyusunan laporan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari pembaca yang bersifat membangun sangat diharapkan demi kemajuan dan kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang. Harapan penulis semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak pada umumnya serta perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan pada khususnya. Amin.

Wassalamu' alaikum Wr.Wb.

Yogyakarta, 30 November 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL DEPAN I
HALAMAN JUDUL II
HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING III
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI IV
HALAMAN PERNYATAAN V
KATA PENGANTAR VI
DAFTAR ISI VII
DAFTAR GAMBAR X
DAFTAR TABEL XI
DAFTAR LAMPIRAN XII
INTISARI XIII
ABSTRACT XIV
PENDAHULUAN 1

A. Latar Belakang Masalah 1

B. Rumusan Masalah 3

C. Tujuan Penelitian 3

D. Manfaat Penelitian 4

STUDI PUSTAKA 5

A. Tinjauan Pustaka 5

1. *Mycobacterium tuberculosis* 5

2. Penyakit tuberkulosis 6

3. Rifampisin 10

4. Isoniazid 12

5. Teori Kromatografi 13

6. *High Performance* Liquid *Chromatography* (HPLC) 17

7. Validasi metode 21

B. Landasan Teori 27

C. Hipotesis 27

METODE PENELITIAN 28

A. Bahan dan Alat 28

1. Bahan 28

2. Alat 28

B. Cara Penelitian 28

1. Preparasi fase gerak 28

2. Preparasi larutan standar 28

3. Optimasi kondisi fase gerak 29

4. Pembuatan kurva baku 29

5. Validasi Metode 29

C. Analisis Hasil 31

HASIL DAN PEMBAHASAN 32

A. Optimasi Eluen (Fase Gerak) 33

B. Validasi Metode 36

1. Kurva baku 36

2. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) 39

3. Presisi (keseksamaan) 40

4. Akurasi (perolehan kembali) 42

5. Penetapan kadar 44

KESIMPULAN DAN SARAN 46

A. Kesimpulan 46

B. Saran 46

DAFTAR PUSTAKA 47

LAMPIRAN 49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Bakteri *Micobacterium tuberculosis* pada jaringan dan koloni *Micobacterium tuberculosis*	**5**
Gambar 2.	Struktur kimia Rifampisin	**10**
Gambar 3.	Struktur kimia Isoniazid (INH)	**12**
Gambar 4.	Skema penelitian secara umum	**31**
Gambar 5.	Hasil elusi dengan menggunakan eluen 3 dengan eluen A perbandingan dapar fosfat : asetonitril 96:4 dan eluen B perbandingan dapar fosfat : asetonitril 60:40, kolom C18, detektor UV-VIS, kecepatan alir 1,5 ml/menit, elusi gradien, panjang gelombang 238 nm	**34**
Gambar 6.	Kurva baku INH	**37**
Gambar 7.	Kurva baku rifampisin	**38**

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Rekomendasi regimen terapi pada masing-masing diagnosis	**9**
Tabel II.	Jenis, Sifat dan Dosis OAT	**10**
Tabel III.	Perbandingan Kolom Konvensional dengan Kolom Mikrobor	**19**
Tabel IV.	Karakteristik Detektor HPLC	**20**
Tabel V.	Elemen-elemen Data yang Dibutuhkan untuk Uji Validasi	**23**
Tabel VI.	Karakteristik Validasi dan Jenis Prosedur Analisisnya	**24**
Tabel VII.	Variasi Komposisi Fase Gerak yang Digunakan Dalam Optimasi	**29**
Tabel VIII.	Mekanisme Elusi	**29**
Tabel IX.	Parameter Uji Kesesuaian Sistem	**36**
Tabel X.	Kurva Baku INH	**37**
Tabel XI.	Kurva Baku Rifampisin	**38**
Tabel XII.	Nilai Linearitas INH dan Rifampisin Berdasarkan Nilai r dan V_{x0}	**39**
Tabel XIII.	Nilai LOD dan LOQ Senyawa INH dan Rifampisin ..	**40**
Tabel XIV.	Nilai Presisi AUC INH dan Rifampisin	**41**
Tabel XV.	Nilai Presisi Waktu Retensi INH dan Rifampisin	**41**
Tabel XVI.	Nilai Akurasi Senyawa INH pada 3 Seri Kadar yang Berbeda	**43**
Tabel XVII.	Nilai Akurasi Senyawa INH pada 3 Seri Kadar yang Berbeda	**43**
Tabel XVIII.	Pengukuran Kadar INH Dalam Sampel	**44**
Tabel XIX.	Pengukuran Kadar INH Dalam Sampel	**45**

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Perhitungan pengenceran seri kadar kurva baku campuran INH dan rifampisin	**49**
Lampiran 2.	Perhitungan stok pembuatan sampel 100 / 150 ppm (INH/rifampisin)	**50**
Lampiran 3.	Perhitungan nilai Vxo INH dan rifampisin	**51**
Lampiran 4.	Perhitungan parameter uji kesesuaian sistem	**53**
Lampiran 5.	Perhitungan LOD dan LOQ INH-Rifampisin	**54**
Lampiran 6.	Perhitungan presisi INH dan rifampisin	**55**
Lampiran 7.	Perhitungan akurasi INH dan rifampisin	**58**
Lampiran 8.	Penetapan kadar INH dan rifampisin dalam sampel	**62**
Lampiran 9.	Surat persetujuan pemberian bahan baku produksi dari PT. Sanbe Farma	**66**
Lampiran 10.	*Certificate of Analysis* (CoA) rifampicin	**67**
Lampiran 11.	*Certificate of Analysis* (CoA) INH	**68**
Lampiran 12.	Kromatogram kurva baku INH dan rifampisin dengan seri kadar 30/45, 50/75, 70/105, 90/135, dan 110/165ppm	**60**
Lampiran 13.	Kromatogram presisi INH dan rifampisin	**72**
Lampiran 14.	Kromatogram akurasi INH dan rifampisin	**78**
Lampiran 15.	Kromatogram pengukuran INH dan rifampisin dalam sampel	**83**
Lampiran 16.	Foto beberapa alat yang digunakan dalam penelitian	**88**

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ISONIAZID-RIFAMPISIS DALAM OBAT ANTI-TUBERKULOSIS DENGAN METODE *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*

INTISARI

Metode analisis INH-rifampisin yang direkomendasikan oleh USP menggunakan 2 eluen yang terdiri dari kombinasi dapar fosfat-asetonitril dengan perbandingan 96:4 dan 45:55, kecepatan alir 1,5 ml/menit dengan *running-time* 15 menit. Oleh karena itu perlu dimodifikasi untuk mempersingkat r*unning time*-nya. Modifikasi dilakukan dengan mengubah komposisi fase gerak dan waktu transfer eluen dari menit ke-5 menjadi menit ke-4. Tujuan dari penelitian ini untuk memastikan metode analisis yang telah dimodifikasi memiliki validitas baik dan dapat mengukur sampel di lapangan. Validasi metode meliputi pengukuran linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi dan batas kuantitasi. Hasil penelitian dibandingkan dengan persyaratan yang ada pada *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) untuk parameter validasi dan *United States Pharmacopeia* (USP) untuk penetapan kadar OAT. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa metode HPLC dapat dikembangkan dan memiliki validitas yang baik untuk mengukur campuran INH-rifampisin. Hal ini dapat dilihat dari nilai regresi INH dan rifampisin yaitu 0,999. Persen RSD INH 0,20 % dan 0,11% sedangkan rifampisin 0,63% dan 0,06%. Persen *recovery* INH 99,92%, 99,03% dan 96,14% sedangkan untuk rifampisin 95,47%, 99,33% dan 94,35%. Persentase kadar INH dalam sampel sebesar 100,04%, 99,03% dan 95,97% sedangkan rifampisin sebesar 94,62%, 99,21% dan 93,94%.

Kata kunci : INH-rifampisin, HPLC, validasi metode

DEVELOPMENT AND VALIDATION ANALITYCAL METHOD OF ANTI-TUBERCULOSIS DRUG CONTAINS ISONIAZID-RIFAMPISIN WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

ABSTRACT

Recomended analitycal method of isoniazid-rifampicin from USP use 2 mobile phase consists of combination phosphate buffer and acetonitrile with comparation 96:4 and 45:55, flow 1,5 ml/min, with 15 minutes running time. So, it needs tobe modified for shrinking it's running time. Modification is undergone with changing mobile phase composition dan mobile phase transfer time from 5^{th} minute to 4^{th} minute. This research has purpose to ensure modified analytical method has good validity and can measure samples in the field. Validation methods involves measurement of linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantitation. The results are compared with the existing requirements of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) for parameter validation and United States Pharmacopeia (USP) for the assay of OAT. Results from the study showed that the HPLC method can be developed and has good validity for measuring INH-rifampicin mixture. It can be seen from the regression of INH and rifampin is 0.999. Percent RSD INH 0,20 % and 0.11% whereas rifampin 0.63% and 0.06%. Percent recovery INH 99.92%, 99.03% and 96.14% for rifampin 95.47%, 99.33% and 94.36%. Percentage levels of INH in sample 100.035%, 99.032% and 95.97%, while rifampin 94.619%, 99.213% and 93.942%.

Keywords : INH-rifampicin, HPLC, validation method

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi paling mematikan di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang bisa menyebabkan infeksi laten atau infeksi yang progresif. Jika tidak diobati atau tidak diobati dengan sempurna, TB dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang progresif dan bahkan kematian [(1)]. Berdasarkan hasil pengamatan dan penelitian yang dilakukan oleh *World Health Organization* (WHO), diperkirakan sekitar 8,8 juta kasus TB terjadi pada tahun 2010 dengan 5,7 juta kasus baru dengan 1,1 juta kematian yang diakibatkan oleh penyakit ini. Selain itu, diperkirakan 10 juta anak-anak menjadi yatim piatu karena kematian orang tua mereka yang disebabkan oleh TB. Hasil tersebut juga menempatkan Indonesia diperingkat keempat setelah India, China dan Afrika Selatan dalam menyumbang jumlah kasus TB di dunia dengan jumlah penderita yang mencapai 0,37 – 0,54 juta orang [(2)].

Pengobatan tuberkulosis aktif memerlukan kombinasi obat. Regimen standar untuk pengobatan TB adalah isoniazid, rifampisin, pirazinamid, dan etambutol selama 2 bulan, dilanjutkan dengan isoniazid dan rifampisin selama 4 bulan. Obat-obat yang diberikan pada pasien TB umumnya berbentuk Kombinasi Paket (kombipak) dan *Fix Dose Combination* (FDC). Hal ini didasarkan pada faktor kepraktisan yang diharapkan dapat meningkatkan kepatuhan pasien TB dalam mengkonsumsi OAT (Obat Anti Tuberkulosis) sehingga terapi TB dapat optimal. FDC biasanya tersedia dalam kombinasi 4 antibiotik (rifampisin-isoniazid (INH)-pirazinamid-etambutol) untuk pengobatan awal dan kombinasi 2 antibiotik (rifampisin-INH) untuk pengobatan selanjutnya [(3)].

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh *Food Drug Administration* (FDA) dan Universitas Botswana diketahui bahwa 31 % FDC yang beredar di pasaran Amerika, ternyata *subdose* [(4)]. FDC yang *subdose* selama proses terapi dapat menurunkan efikasinya dan meningkatkan risiko kekambuhan [(1)]. Selain itu risiko

resistensi terhadap OAT menjadi lebih tinggi. Jika Amerika yang merupakan negara maju tidak dapat menjamin semua FDC yang diproduksinya mengandung dosis antibiotik sesuai dengan ketentuan, maka untuk Indonesia sangat perlu dilakukan penelitian untuk memastikan dosis FDC yang diproduksi. Mengingat Indonesia menempati urutan ke-4 jumlah penderita TB dunia, ketepatan dosis FDC di pasaran Indonesia sangatlah penting untuk menjamin optimalnya terapi TB.

Penelitian ini berfokus pada proses pemastian dosis zat aktif yang terdapat pada FDC rifampisin-INH, karena rifampisin-INH merupakan kombinasi antibiotik yang digunakan pada fase lanjutan terapi TB, dengan durasi pemberiannya paling lama (4-5 bulan) dibandingkan dengan kombinasi antibiotik lain (1-2 bulan) [(3)].

Metode analisis yang direkomendasikan oleh WHO untuk mengukur kadar tiap antibiotik yang terkandung dalam sediaan FDC adalah *Thin Layer Chromatography* (TLC) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) [(5)]. Tetapi metode-metode tersebut memiliki beberapa kelemahan. Untuk metode *Thin Layer Chromatography* (TLC) kekurangannya yakni kesulitan dalam menentukan lama waktu elusi, keterbatasan dalam memilih fase diam dan detektor serta kesulitan untuk menilai tingkat kejenuhan fase gerak dalam bejana. Sedangkan untuk metode HPLC memerlukan waktu pengerjaan (*running time*) yang lama sehingga kurang efektif dan efisien. Namun, dibandingkan TLC metode HPLC memiliki keunggulan dalam selektivitas dan sensitivitas sehingga menjadi metode yang direkomendasikan dalam USP (*United State Pharmacopoeia*) [(6)]. Oleh karena itu, peneliti memilih metode HPLC untuk dikembangkan sehingga dapat memangkas *running time*-nya. Pengembangan yang akan peneliti lakukan pada metode HPLC ini yakni dengan mengubah komposisi fase gerak sehingga akan mengubah faktor retensi yang diharapkan mempercepat proses elusi isoniazid dan rifampisin. Peneliti juga akan mengubah waktu transfer eluen A ke eluen B dari yang awalnya dilakukan pada menit ke-5 menjadi menit ke-4. Sehingga akan merubah *running time* dari 15 menit menjadi 10 menit. Dibandingkan metode HPLC yang lain, metode yang akan dikembangkan ini lebih cepat karena metode yang lain memiliki waktu retensi minimal 13 menit [(7)] [(8)]. Selain itu metode ini hanya menggunakan detektor UV-Vis yang lazim dimiliki oleh industri farmasi dibandingkan dengan detektor spektra massa [(7)]. Meskipun ada metode HPLC yang memiliki waktu

retensi hanya 1,5 menit [9] tetapi metode ini menggunakan kromatografi cair tekanan sangat tinggi dengan kolom yang baru dengan diameter dan panjang kolom yang lebih kecil serta ukuran partikel fase diam yang lebih kecil pula. Sebelum digunakan untuk menganalisis kandungan antibiotik yang terkandung dalam sediaan FDC, terlebih dahulu metode HPLC yang telah dimodifikasi ini harus divalidasi. Validasi metode perlu dilakukan karena metode ini telah mengalami perubahan dari metode semula sehingga perlu dilakukan serangkaian pembuktian untuk mengetahui apakah modifikasi metode ini memiliki validitas yang baik atau tidak [10].

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah metode HPLC dapat dimodifikasi untuk mempercepat proses analisis sediaan obat TB FDC?
2. Apakah metode HPLC yang telah dimodikasi memiliki validitas yang baik?
3. Apakah kadar rifampisin-INH (zat aktif) yang terkandung dalam sediaan FDC obat TB sesuai dengan standar yang tertera dalam *United States Pharmacopeia* (USP)?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui modifikasi metode HPLC untuk mempercepat proses analisis sediaan obat TB FDC
2. Membuktikan metode HPLC yang telah dimodifikasi memiliki validitas yang baik
3. Mengetahui kesesuaian kadar rifampisin-INH dalam sediaan FDC obat TB dengan standar yang tertera dalam USP

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang bisa didapat dari penelitian ini antara lain didapatkannya metode HPLC yang lebih cepat dalam menganalisis obat TB FDC sehingga waktu pengerjaan yang lebih singkat. Sehingga dalam lingkup mikro akan membantu industri farmasi dalam proses pemastian kualitas obat-obat FDC yang diproduksi karena dapat menghemat penggunaan waktu dan biaya analisisnya. Sedangkan dalam lingkup makro, hasil penelitian ini bermanfaat untuk mengoptimalkan terapi dan menurunkan angka resistensi bakteri *M. tuberculosis* yang ditimbulkan oleh penggunaan antibiotik yang *subdose*.

BAB II
STUDI PUSTAKA
A. Tinjauan Pustaka

1. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri penyebab tuberkulosis (TB). Bakteri ini bisa menyebabkan infeksi laten atau infeksi yang progresif. Jika tidak diobati atau tidak diobati dengan sempurna, TB dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang progresif dan bahkan kematian [(1)]. Bakteri *M. tuberculosis* pada jaringan dan koloni bakterinya dapat dilihat pada Gambar 1.



(a) (b)

Gambar 1. Bakteri *M. tuberculosis pada jaringan (a)* dan koloni bakteri *M.tuberculosis* (b) [(11)].

Klasifikasi bakteri penyebab TB (*Mycobacterium tuberculosis*):

Kerajaan	:	*Bacteria*
Filum	:	*Actinobacteria*
Ordo	:	*Actinomycetes*
Subordo	:	*Corynebacterineae*
Famili	:	*Mycobacteriaceae*
Genus	:	*Mycobacterium*
Spesies	:	*M. tuberculosis*
Nama binominal	:	*Mycobacterium tuberculosis* [(11)]

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri yang berbentuk batang, panjang antara 1-4 µm dan lebar antara 0,2-0,5 µm, tahan terhadap asam dan membutuhkan oksigen untuk dapat hidup dan berkembang biak (aerob). *M. tuberculosis* berkembang baik pada pH 6-6,7 dan pH optimalnya adalah sekitar 6,8. Waktu inkubasi yang diperlukan 3-8 minggu, dengan melihatnya dua kali setiap minggu. Bila dalam waktu 8 minggu belum ada pertumbuhan, biakan dinyatakan tidak ada pertumbuhan, dengan terlebih dahulu dilakukan pewarnaan tahan asam. Waktu regenerasi dari *M. tuberculosis* pada media buatan 20–24 jam. Waktu ini dapat diprcepat menjadi 13-15 jam dengan penambahan serum sapi pada media dasar. *M. tuberculosis* dapat tahan terhadap disinfektan lemah dan dapat bertahan pada kondisi kering selama beberapa minggu [(12)].

2. Penyakit Tuberkulosis

a. Patofisiologi

Respon sel limfosit T yang baik sangat penting untuk mengontrol infeksi *M. tuberculosis*. Pada percobaan menggunakan tikus, telah ditemukan respon dua sel limfosit T yang berbeda yakni T-helper tipe 1 dan T-helper tipe 2. Respon T-helper tipe 1 lebih utama untuk TB dan respon T-helper tipe 2. Hal ini termasuk efek merusak yang potensial dari interleukin-4 tidak diinginkan. Beberapa peneliti berpendapat bahwa dikotomi tersebut telah jelas pada penelitian menggunakan tikus dan pada banyak manusia, respon sel-T mungkin diklasifikasikan sebagai TH0 (elemen dari TH1 dan TH2). Dalam kasus yang sama, limfosit-T mengaktivasi makrofag yang meliputi dan membunuh *mycobacteria*. Limfosit-T juga menghancurkan makrofag yang tidak matang yang menjadi inang *M. tuberculosis* tapi tidak mampu membunuhnya. Sel CD4+ merupakan sel T primer yang dilibatkan, bersama sel T γδ dan sel T CD8+. Sel CD4+ memproduksi interferon γ (INF-γ) dan sitokin lain, termasuk IL-2 dan IL-10, yang mangatur respon imun terhadap TB. Sel T juga berespon terhadap antigen yang dihasilkan oleh mycobacterium, tetapi kunci antigen yang memicu rspon imun blum dapat diidentifikasi. *Tumor Necrosis Factor*-α (TNF-α) and INF-γ merupakan sitokin-sitokin yang sangat penting untuk mengatur respon sel inang yang diaturnya. Pasien-pasien penderita *rheumatoid artritis* yang diterapi menggunakan penghambat TNF-α (inflix-imab) memiliki tingkat reaktivasi TB yang tinggi. Sehingga pasin-pasien yang

diketahui memiliki aktivitas TNF-α atau INF-γ yang lebah harus diwaspadai terhadap infeksi TB dan diutamakan untuk memperoleh pengobatan yang tepat [(1)].

M. tuberculosis memiliki beberapa cara untuk menghindari atau bertahan dari respon imun sel inang. *M. tuberculosis* dapat meghambat penggabungan lisosom pada fagosom di dalam makrofag. Hal ini mencegah enzim penghancur yang terdapat dalam lisosom untuk mencapai bakteri yang terperangkap dalam fagosom. Akibatnya, bakteri-bakteri *M. tuberculosis* dapat melarikan diri menuju sitoplasma. *M. tuberculosis* yang virulen dapat memperbanyak diri dalam sitoplasma makrofag untuk kemudian melanjutkan penyebarannya. Terakhir, lipoarabinomannan yang merupakan struktur polisakarida utama dari dinding sel *mycobacteria* dapat menghambat respon imun sel inang. Lipoarabinomannan menginduksi sitokin penekan sistem imun yang kemudian mencegah aktivasi makrofag. Lipoarabinomannan juga dapat mnangkap oksigen sehingga mencegah serangan dari anion superoksida, hidrogen peroksida oksigen singlet dan radikal hidroksil. Mekanisme pertahanan diri ini menjadikan *M. tuberculosis* organisme yang sulit untuk dikendalikan [(1).]

b. Gejala klinis pasien TB

Gejala utama TB adalah batuk terus menerus dan berdahak selama 3 minggu atau lebih. Gejala tambahan yang sering dijumpai: dahak bercampur darah, batuk darah, sesak nafas dan rasa nyeri dada, badan lemah, nafsu makan menurun, berat badan turun, rasa kurang enak badan (malaise), berkeringat malam walaupun tanpa kegiatan, demam, dan meriang lebih dari 1 bulan. Gejala-gejala tersebut dijumpai pula pada penyakit paru selain tuberkulosis, oleh sebab itu setiap orang yang datang ke Unit Pelayanan Kesehatan (UPK) dengan gejala tersebut di atas harus dianggap sebagai seorang " *Suspect* tuberkulosis " atau tersangka penderita TB dan perlu dilakukan pemeriksaan dahak secara mikroskopis langsung [(3)].

Penemuan penderita tuberkulosis pada orang dewasa dilakukan secara pasif artinya penjaringan tersangka penderita dilaksanakan pada mereka yang datang berkunjung UPK. Penemuan secara pasif tersebut didukung dengan penyuluhan secara aktif baik oleh petugas kesehatan maupun masyarakat untuk meningkatkan cakupan penemuan

tersangka penderita cara ini biasa dikenal dengan sebutan *passive promotive case finding* (penemuan penderita secara pasif dengan promosi yang aktif). Selain itu semua kontak penderita TB Paru Basil Tahan Asam (BTA) positif dengan gejala sama harus diperiksa dahaknya. Seorang petugas kesehatan diharapkan menemukan tersangka penderita sedini mungkin, mengingat tuberkulosis adalah penyakit menular yang dapat mengakibatkan kematian. Semua tersangka penderita harus diperiksa 3 spesimen dahak dalam waktu 2 hari berturut-turut yaitu sewaktu pagi sewaktu (SPS) [(3)].

Penemuan penderita tuberkulosis pada anak: penemuan penderita tuberkulosis pada anak merupakan hal yang sulit. Sebagian besar diagnosis tuberkulosis anak didasarkan atas gambar klinis, gambar radiologis dan uji tuberkulin [(3)].

Tabel I. Rekomendasi regimen terapi pada masing-masing diagnosis [3]

Kategori diagnosis TB	**Pasien TB**	**Regimen pengobatan TB**	
		Fase awal	**Fase lanjutan**
I	Pasien baru positif; negatif PTB dengan melibatkan parenkim; bersamaan dengan penyakit HIV atau bentuk berat ekstra pulmonar TB	Pilihan 2HRZE	Pilihan 4 HR 4 $(HR)_3$
		Pilihan 2HRZE	Pilihan 4 $(HR)_3$ atau 6 HE
II	Pasien positif PTB pada kekambuhan dan pengobatan yang salah	Pilihan 2HRZES/1HRZE	Pilihan 5HRE
		Pilihan $2(HRZES)_3/1HRZE_3$	Pilihan $5(HRE)_3$
	Pengobatan yang salah pada kategori 1 dengan situasi program yang dijalankan telah adekuat; dapat menggunakan regimen kategori IV	Desain standar yang spesial, tergantung dari masing-masing individu	
III	Pasien baru dengan negatif PTB,dan lebih sedikit mengalami bentuk ekstra pulmonary TB	Pilihan 2HRZE	Pilihan 4HR 4 $(HR)_3$
		Pilihan 2 $(HRZE)_3$ Atau 2 HRZE	Pilihan 4 $(HR)_3$ atau 6 HE
IV	Kronik (pada sputum tetap positif setelah pengawasan pengobatan kembali), suspek MDR-TB	Desain standar yang spesial atau regimen secara individual	

Keterangan

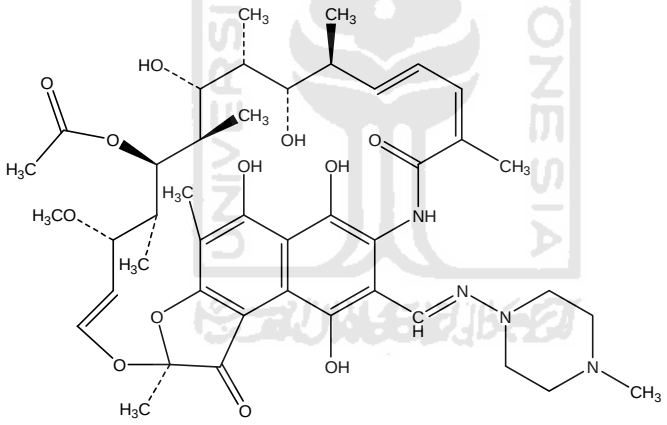
H : INH
R: Rifampisin
Z: Streptomycin
E: Ethambutol
MDR : *Multi drugs resistance*
PTB : *Pulmonary tuberculosis*

Nomor didepan regimen terapi menandakan lamanya terapi, angka yang ditulis agak kebawah menandakan jumlah obat yang harus diminum (hari per minggu)

Tabel II. Jenis, sifat dan dosis OAT [3]

Jenis OAT	Sifat	Dosis yang direkomendasikan (mg/kg)	
		Harian (jumlah butir)	3 x seminggu (jumlah butir)
Isoniazid (H)	Bakterisid	5 (4-6)	10 (8-12)
Rifampisin (R)	Bakterisid	10 (8-12)	10 (8-12)
Pyrazinamide (Z)	Bakterisid	25 (20-30)	35 (30-40)
Streptomycin (S)	Bakterisid	15 (12-18)	15 (12-18)
Ethambutol (E)	Bakteriostatik	15 (15-20)	30 (20-35)

3. Rifampisin



Gambar 2. Struktur kimia rifampisin [13].

Rifampisin merupakan derivat semisintetik dari rifamisin, antibiotika yang dihasilkan oleh *Streptomyces mediterranei*. Obat ini secara in vitro aktif terhadap beberapa kokus gram-positif dan gram-negatif, beberapa bakteri usus, mikobakteria, klamidia, dan virus pox. Meskipun banyak meningokokus dan mikobakteria yang dapat dihambat oleh kurang dari 1 µg/ml rifampisin, terdapat beberapa mutan yang sangat resisten pada semua populasi mikroba dengan frekuensi 10^{-6} samai 10^{-5}. Pemberian rifampisin untuk jangka panjang sebagai obat tunggal, memberi peluang bagi mutan yang sangat resisten ini untuk muncul. Tidak terdapat resistensi-silang dengan obat-obatan antimikroba lain [12].

Rifampisin berbentuk serbuk kristal berwarna merah-coklat atau coklat kemerahan, sukar larut dalam air, alkohol dan aseton, larut dalam metil alkohol, pH 4,5 sampai 6,5. Penyimpanan pada temperatur tidak lebih dari 25^{o}C pada atmosfer nitrogen dalam wadah kedap udara, terlindung dari cahaya [(13)]. Rifampisin dapat terdegradasi oleh cahaya dan panas menjadi rifampisin kuinon, rifamicin, rifampisin N-oxide dan 3-formilrifamisin [(14)]. Sedangkan dalam tubuh, rifampisin dimetabolisme menjadi desasetil rifampisin [(15)].

Berdasarkan USP, sediaan yang mengandung rifampisin dianalisis menggunakan HPLC dengan fase gerak campuran air, asetonitril, dapar fosfat, 1 M asam sitrat, 0,5 M sodium perklorat (510:350:100:20:20). Pelarut yang digunakan merupakan campuran air, asetonitril, 1 M potasium fosfat dibasa, 1 M potasium fosfat monobasa dan 1 M asam sitrat (640:250:77:23:10). Detektor yang digunakan ialah UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm, kolom ukuran 4,6 mm x 10 cm yang mengandung 5 µm L7 dan laju alir 1,5 ml/menit [(6)].

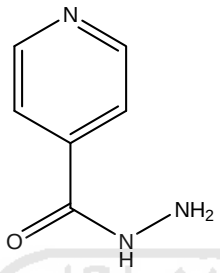
Rifampisin digunakan pada manajemen terapi aktif tuberkulosis yang dikombinasikan dengan obat TB yang lain. Sebagai profilaksis (terapi pencegahan) pada penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Haemophilus influenza* tipe b dan *Legionella*. Digunakan bersama anti infeksi lain untuk terapi infeksi yang disebabkan oleh *staphylococcus* dan *M. leprae*. Rekomendasi *Food Drug Association* (FDA) untuk ibu hamil: C dan untuk ibu menyusui: tidak direkomendasikan [(16)].

Obat ini dikontraindikasikan pada pasien yang hipersensitif terhadap rifampisin, golongan rifampin atau komponen lain dalam formulasi. Rifampisin dapat digunakan bersama amprenavir, saquinavir/ritonavir atau protease inhibitor yang lain [(16)].

Efek samping yang mungkin timbul antara lain edema, ataxia, perubahan perilaku, bingung, mengantuk, lemah otot, demam, sakit kepala, pruritus, utikaria, agranulositosis, eosinofilia, hemoglobin rendah, hemolisis, hemolitik anemia, trombositopenia (khususnya pada dosis tinggi), hepatitis, *jaundice*, *myalgia*, *osteomalasia*, gagal ginjal akut, hemoglobinuria, hematuria, rash, anoreksia, kram, diare, dan mual [(16)].

Mekanisme aksi dari rifampisin adalah dengan menghambat sintesis *Ribonucleic Acid* (RNA) bakteri dengan berikatan pada subunit beta *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) *dependent* RNA polymerase, memblok transkripsi RNA [16].

4. Isoniazid



Gambar 3. Struktur kimia INH [13].

INH (*isonicotinic acid hydrazide*) merupakan golongan antibiotik yang menghambat sintesis didinding sel [17]. Obat ini mempunyai efek yang sangat kecil terhadap sebagian besar bakteri tetapi aktivitasnya terhadap mikobakteria, terutama *Mycobacterium tuberculosis* sangat mencolok. Sebagian besar *Mycobacterium tuberculosis* dihambat dan dimatikan secara in vitro pada konsentrasi 0,1-1 µg/ml. Tetapi dalam populasi besar *Mycobacterium tuberculosis* biasanya terdapat beberapa bakteri yang resisten. Karena alasan ini, obat tersebut digunakan secara kombinasi dengan obat antimikobakteria lain untuk mengurangi timbulnya *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten [12].

INH berbentuk serbuk kristal putih atau kristal tidak berwarna. Larut dalam 8 bagian air, dalam 50 bagian alkohol, sukar larut dalam kloroform dan sangat sukar larut dalam eter, pH 6,0 sampai 8,0, suhu lebur antara 170-173^{0}C [6]. Penyimpanan pada wadah kedap air pada temperatur 25 ^{o}C dan terlindung dari cahaya. INH memiliki inkompatibilitas dengan gula seperti: glukosa, fruktosa dan sukrosa karena dapat menurunkan absorpsi obat dalam saluran pencernaan akibat pembentukan produk kondensasi [13].

Berdasarkan USP, sediaan yang mengandung INH dianalisis menggunakan HPLC dengan fase gerak larutan yang dibuat dengan melarutkan 4,4 gram sodium dokusat

dalam 600 ml metanol, kemudian ditambah 400 ml air dan disesuaikan pH-nya menjadi 2,5 dengan asam sulfat 2 N. Detektor yang digunakan ialah UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm, kolom ukuran 4,6 mm x 25 cm dan laju alir 1,5 ml/menit [(6)].

INH digunakan pada manajemen terapi pada pasien yang baru saja terinfeksi tuberkulosis atau pasien TB laten. Rekomendasi FDA untuk ibu hamil: C [(16)]. Obat ini dikontraindikasikan terhadap pasien yang hipersensitif terhadap INH, atau komponen lain dalam formulasi. INH juga dikontraindikasikan pada pasien yang mengalami gagal hati akut, memiliki riwayat kerusakan hati selama terapi INH dan riwayat mengalami efek samping berat selama terapi INH [(13)].

Efek samping yang mungkin timbul antara lain hipertensi, palpitasi, takikardi, vaskulitis, depresi, mengantuk, demam, gangguan memori, kejang, rash, anoreksia, mual, muntah, nyeri perut, agranulositosis, anemia, eosinofilia, trombositopenia, hiperbilirubinemia, bilirubinemia, *jaundice,* hepatitis, gangguan fungsi hati, dan lupus [(16)].

5. Teori Kromatografi

a. Pendahuluan

Kromatografi pertama kali dikembangkan oleh ahli botani asal Rusia bernama Michael Tswett pada tahun 1903 untuk memisahkan pigmen berwarna dalam tanaman dengan cara perkolasi ekstrak petroleum eter dalam kolom gelas yang berisi kalsium karbonat. Saat ini kromatografi merupakan teknik pemisahan paling umum dan paling sering digunakan dalam bidang kimia analisis dan dimanfaatkan untuk melakukan analisis, baik analisis kualitatif, kuantitatif, atau preparatif dalam bidang farmasi, lingkungan, industri, dan sebagainya [(18)].

b. Pembagian Kromatografi

Kromatografi dapat dibedakan atas berbagai macam jenis tergantung pada pengelompokannya. Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi: (a) kromatografi adsorbsi; (b) kromatografi partisi; (c) Kromatografi pasangan ion; (d) kromatografi penukar ion; (e) kromatografi eksklusi ukuran; (f) kromatografi afinitas. Sedangkan berdasarkan pada alat yang digunakan, kromatografi dibagi atas: (a) kromatografi kertas; (b) kromatografi lapis tipis

(kromatografi planar); (c) kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT); (d) kromatografi gas [18].

c. Migrasi dan retensi solut

Kecepatan migrasi solut melalui fase diam ditentukan oleh perbandingan distribusinya (D), dan besarnya D ditentukan oleh afinitas relatif antara solut pada kedua fase (fase diam dan fase gerak). Dalam konteks kromatografi, nilai D didefinisikan sebagai perbandingan konsentrasi solut dalam fase diam (Cs) dan dalam fase gerak (Cm).

$$D = \frac{Cs}{Cm}$$

Jadi semakin besar nilai D maka migrasi solut semakin lambat; dan semakin kecil nilai D maka migrasi solut akan semakin cepat. Solut akan terelusi menurut perbandingan distribusinya. Jika perbedaan perbandingan distribusi cukup besar maka campuran-campuran solut akan mudah dan cepat dipisahkan [18].

d. Pemisahan pada kolom

Pada pemisahan campuran-campuran dalam kolom, solut-solut dicirikan dengan waktu retensi (t_R) dan faktor retensi (k') yang berbanding lurus dengan nilai D. Waktu retensi merupakan lamanya waktu yang dibutuhkan solut untuk melewati kolom. Waktu retensi (t_R) dan faktor retensi (k') dihubungkan oleh persamaan berikut:

$$t_R = t_M (1+k')$$

t_M (kadang-kadang dikenal dengan t_0 dan dikenal sebagai waktu mati) merupakan waktu yang dibutuhkan oleh solut yang tidak tertahan untuk melewati kolom. Solut yang tidak tertahan akan bermigrasi dengan kecepatan yang sama dengan fase gerak, karenanya perbandingan distribusi (D) dan faktor retensinya adalah 0. Solut-solut yang mempunyai nilai D dan k' lebih besar dari 0 akan tertahan secara proporsional dan akan mempunyai waktu retensi yang lebih besar daripada t_M [18].

Kondisi kromatografi umumnya diatur sedemikian rupa sehingga nilai k' lebih kecil daripada 20 untuk menghindari waktu retensi yang terlalu panjang. Nilai k' dapat dihitung dengan menyusun ulang persamaan di atas:

$$t_R = t_M (1+k') \rightarrow k' = \frac{(tR-tM)}{tM}$$

Dalam kromatografi eksklusi ukuran, solut dikarakterisasi dengan volume retensi (V_R) yang merupakan volume fase gerak yang dibutukan untuk mengelusi solut dalam kolom. Waktu retensi berbanding langsung dengan volume retensi pada kecepatan alir yang konstan sehingga persamaan diatas dapat ditulis kembali:

$$V_R = V_M (1+k')$$

sementara nilai k' dapat diganti dengan:

$$k' = D (\frac{Vs}{Vm})$$

dengan menggabungkan kedua persamaan ini, maka akan diperoleh:

$$V_R = V_M (1+D \frac{Vs}{Vm})$$

atau

$$V_R = V_M + DVs$$

Vs dan V_M masing-masing merupakan volume fase diam dan volume fase gerak dalam kolom [18].

e. Efisiensi

Tujuan umum pada kromatografi adalah pemisahan yang cukup dari suatu campuran yang akan dipisahkan. Ada 2 parameter yang digunakan untuk menilai kualitas pemisahan kromatografi yakni ukuran banyaknya pelebaran puncak dari masing-masing puncak solut (efisiensi) dan tingkat pemisahan puncak-puncak yang berdekatan (resolusi) [18].

Untuk kolom kromatografi, jumlah lempeng atau *plate number* (N) yang didasarkan pada konsep lemeng teoretis pada distilasi kolom digunakan sebagai ukuran efisiensi. Selain dengan N, efisiensi kolom dalam kromatografi secara umum berkaitan dengan waktu retensi, yakni lamanya waktu komponen atau molekul yang akan dianalisis dalam kolom [18].

Dengan menganggap profil puncak kromatogram adalah sesuai kurva Gaussian, maka N didefinisikan :

$$N = (\frac{tR}{\sigma t})^2$$

keterangan:

tR : waktu retensi solut
σt : standar deviasi lebar puncak

Dalam prakteknya, lebih mudah untuk mengukur lebar puncak (Wb) atau lebar setengah puncak ($W_{h/2}$) sehingga diperoleh :

$$N = 16 \left(\frac{tR}{Wb}\right)^2$$

$$N = 5{,}54 \left(\frac{tR}{Wh/2}\right)^2$$

f. Resolusi kromatogram

Resolusi didefinisikan sebagai perbedaan antara waktu retensi 2 puncak yang saling berdekatan ($\Delta t_R = t_{R2}-t_{R1}$) dibagi dengan rata-rata lebar puncak (W_1+W_2)/2 sehingga diperoleh persamaan:

$$Rs = \frac{2\Delta tR}{(W1+W2)}$$

Dari persamaan tersebut dapat diketahui bahwa yang sangat berpengaruh terhadap pemisahan suatu komponen adalah waktu retensi masing-masing solut serta lebar puncak masing-masing komponen yang dipisahkan. Nilai Rs harus mendekati atau lebih dari 1,5 karena akan memberikan pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*) [18].

Persamaan tersebut hanya menggunakan parameter yang tertera dalam kromatogram yang terjadi, sehingga masalah kesempurnaan pemisahan secara keseluruhan yang tergantung pada berbagai faktor belum dapat dimanfaatkan. Langkah untuk menaikkan selisih t_R dan memperkecil W belum terlihat. Oleh karena itu, persamaan berikut ini akan menggambarkan faktor-faktor yang belum dimanfaatkan

$$Rs = \frac{1}{4}(\sqrt{N})\left[\frac{\alpha-1}{\alpha}\right]\left[\frac{k'}{1+k'}\right]$$

karena N = L/H maka persamaan dapat diubah menjadi:

$$Rs = \frac{1}{4}\left(\sqrt{\frac{L}{H}}\right)\left[\frac{\alpha-1}{\alpha}\right]\left[\frac{k'}{1+k'}\right]$$

yang mana:

Rs : resolusi
N : bilangan lempeng
A : selektivitas
k’ : faktor retensi

Selektivitas (α) untuk pemisahan 2 komponen A dan B dapat dirumuskan dengan:

$$\alpha = \frac{tRA - tM}{tRB - tM}$$

Selektivitas dapat diubah dengan mengubah susunan fase diam dan fase gerak. Menaikkan selektivitas akan menghasilkan pergerakan satu puncak relatif terhadap lainnya. Efisiensi suatu pemisahan ditunjukkan dengan faktor N yang akan berubah dengan mengubah panjang kolom (L) atau kecepatan aliran fase gerak. Menaikkan faktor N suatu kolom akan menyebabkan penyempitan 2 puncak sehingga W menjadi kecil dan resolusinya lebih besar. Faktor k' berubah dengan mengubah kekuatan fase gerak [18].

6. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

a. Pendahuluan

HPLC atau dikenal dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dikembangkan akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, HPLC merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel disejumlah bidang, antara lain: farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri-industri makanan [18].

Kegunaan umum HPLC adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis; analisis ketidakmurnian (*impurities*); analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap (*non-volatile*); penentuan molekul-molekul netral, ionik, mauppun *zwitter ion;* isolasi dan pemurnian senyawa; pemisahan senyawa-senyawa yang struktrunya hampir sama; pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah kecil (*trace elements*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri. HPLC merupakan proses yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif [18].

b. Cara kerja HPLC

Kromatografi merupakan teknik zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi karena zat-zat ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan zat-zat terlarut ini diatur oleh distribusi zat terlarut dalam fase gerak dan fase diam. Kesuksesan dalam penggunaan kromatografi cair ditentukan oleh penggabungan yang tepat dari berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel [19].

Instrumentasi HPLC pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok, yaitu: (1) wadah fase gerak, (2) sistem penghantaran fase gerak, (3) alat untuk memasukkan sampel, (4) kolom, (5) detektor, (6) wadah penampung buangan fase gerak, (7) tabung penghubung, dan (8) komputer atau integrator atau perekam [19].

c. Fase gerak pada HPLC

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatkan polaritas pelarut. Sedangkan untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut [19].

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fase gerak berubah selama elusi). Elusi bergradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas [19].

d. Kolom pada HPLC

Kolom merupakan jantung dari proses pemisahan HPLC. Pada HPLC dikenal 2 jenis kolom yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Perbandingan kolom konvensional dan kolom mikrobor dapat dilihat pada Tabel III

Tabel III. Perbandingan Kolom Konvensional dengan Kolom Mikrobor [20]

Parameter	Kolom Konvensional	Kolom Mikrobor
Tabung Kolom	*Stainless steel* Panjang 3, 10, 15, 20 dan 25 cm Diameter luar 0,25 inchi Diameter dalam 4,6 mm	*Stainless steel* Panjang 25 dan 50 cm Diameter luar 0,25 inchi Diameter dalam 1 atau 2 mm
Fase Diam	Porous, silika ukuran kecil, silika yang dimodifikasi secara kimiawi (*bonded phase*), atau polimer-polimer stiren/ divinil benzen. Rata-rata diameter partikel 3,5 atau 10 μm dengan kisaran sempit	Porous, silika ukuran kecil, silika yang dimodifikasi secara kimiawi (*bonded phase*), atau polimer-polimer stiren/ divinil benzen. Rata-rata diameter partikel 3,5 atau 10 μm dengan kisaran sempit
Tekanan Operasional	500 – 300 psi (35 – 215 bar)	1000 – 5000 psi (70 – 350 bar)
Fase Gerak	Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alkohol untuk fase normal. Untuk fase terbalik digunakan metanol atau asetonitril + air atau buffer. Kecepatan alir: 1 – 3 ml/menit	Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alkohol untuk fase normal. Untuk fase terbalik digunakan metanol atau asetonitril + air atau buffer. Kecepatan alir: 10 – 100 μl/menit. *Modifikasi Instrumen*: Sistem penghantaran elarut yang mampu memberikan kontrol aliran dibawah 10 μl/menit; katup injeksi sampel bervolume kecil; sel detektor bervolume kecil
Kinerja	Efisiensi meningkat dengan berkurangnya ukuran fase diam, akan tetapi umur kolom dengan ukuran partikel 3 μm lebih pendek.	Sangat efisien dan sensitif, akan tetapi lambat. Konsumsi fase gerak hanya $^1/_4$ dari kolom konvensional.

e. Detektor HPLC

Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi 2 golongan, yaitu: detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa; golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia [19]. Beberapa detektor yang paling sering digunakan pada HPLC dapat dilihat pada Tabel IV

Tabel IV. Karakteristik Detektor HPLC [20]

Detektor	Sensitifitas (g/ml)	Kisaran Linier	Karakteristik
Absorbansi UV-Vis Fotometer filter Spektrofotometer Spektrofotometer PDA (*Photo Diode Array*)	 5×10^{-10} 5×10^{-10} $> 2 \times 10^{-10}$	 10^4 10^5 10^5	Sensitivitas bagus, paling sering digunakan,selektivitas terhadap gugus-gugus dan struktur-struktur yang tidak jenuh.
Fluoresensi	10^{-12}	10^4	Sensitivitas sangat bagus, selektif, tidak pekaterhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.
Indeks Bias	5×10^{-7}	10^4	Hampirbersifat universal akan tetapi sensitivitasnya sedang. Sangat sensitif terhadap suhu, tidak dapat digunakan dalam elusi bergradien.
Elektrokimia Konduktrimetri Amperometri	 10^{-8} 10^{-12}	 10^4 10^5	Peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak, tidak dapat digunakan pada elusi bergradien. Hanya mendeteksi zat-zat terlarutionik.Sensitivitas sangat bagus, selektif tetapi bermasalah adanya kontaminasi elektroda.

7. Validasi Metode

a. Definisi

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya [(21)]. Proses validasi terdiri atas paling tidak 4 langkah nyata, yaitu: (1) validasi perangkat lunak (*software validation*), (2) validasi perangkat keras/instrumen (*instrument/hardware validation*), (3) validasi metode, (4) kesesuaian sistem (*system suitability*) [(18)].

Proses validasi dimulai dengan perangkat lunak yang tervalidasi dan sistem yang terjamin, lalu metode yang divalidasi menggunakan sistem yang terjamin dikembangkan. Akhirnya, validasi total diperoleh dengan melakukan kesesuaian sistem. Masing-masing tahap dalam proses validasi ini merupakan suatu proses yang secara keseluruhan bertujuan untuk mencapai kesuksesan validasi [(18)].

Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reprodusibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis [(18)]. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika:

(1) metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu,
(2) metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi,
(3) penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu,
(4) metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda,
(5) untuk mendemonstrasikan kesetaraan antara 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku [(18)].

b. Kategori uji yang terdapat dalam USP dan *International Conference on Harmonization* (ICH):

(1) Kategori I

Metode untuk kuantifikasi komponen mayor dalam produk obat ruahan *Active Pharmaceutical Ingredient* (API), termasuk senyawa-senyawa pengawet dalam produk akhir obat, diklasifikasikan dalam kategori I. Metode uji dan keseragaman kandungan masuk dalam kategori ini. Metode kategori I menunjukan bahwa klaim kandungan produk obat memenuhi persyaratan yang dikehendaki. Metode-metode pengujian biasanya dilakukan dengan menggunakan sampel komposit (misalkan 20 sampel), sementara penentuan keseragaman kandungan dilakukan dengan satu unit sampel sediaan obat [(22)].

Analisis sekelumit tidak disyaratkan pada uji keseragaman kandungan ini, karenanya penentuan *Limit Of Detection* (LOD) dan *Limit Of Quantitation* (LOQ) dalam uji ini tidaklah penting. Meskipun demkian, nilai LOD dan LOQ penting dilakukan jika penentuan keseragaman kandungan terhadap suatu produk obat yang mengandung zat aktif kedua yang mempunyai kandungan relatif 0,5 % atau lebih kecil terhadap kandungan zat aktif mayor [(22)].

(2) Kategori II

Metode kategori II ditujukan untuk menentukan pengotor/ pengganggu (*impurities*) dalam ruahan obat (bulk), produk-produk degradasi dalam produk obat akhir atau dalam proses pembersihan (*cleaning process*). Metode ini lebih lengkap dibagi menjadi dua yaitu ke dalam uji kuantitatif dan uji batas (*limit test*) [(22)].

(a) Kuantitatif

Penentuan pengotor (*impurities*) dan produk-produk degradasi melibatkan analisis sekelumit yang mana komponen-komponen ini berada pada level kurang dari 1 % terhadap konsentrasi senyawa aktif obat atau dari klaim label yang tertera dalam produk akhir obat. Semua parameter yang dibutuhkan untuk diuji pada kategori I dan nilai LOQ harus ditentukan untuk metode-metode jenis ini. Metode-metode pembersihan (*cleaning*

method) merupakan suatu kasus khusus yang mana metode ini dapat dimasukkan ke dalam uji kuantitatif ataupun ke dalam uji batas [22].

(b) Uji batas (*limit test*)

Dalam kasus uji batas, tidak ada proses kuantifikasi yang terlibat. Sampel dikerjakan terhadap standar yang disiapkan pada level tertentu. Respon sampel ditentukan baik diatas atau di bawah jumlah standar, dan hasilnya dinyatakan apakah memenuhi atau tidak terhadap spesifikasi yang ditentukan. Nilai LOQ tidak diperlukan dalam metode ini, akan tetapi LOD diperlukan. Spesifisitas merupakan parameter lain selain *ruggedness* yang diperlukan untuk validasi jenis metode ini, meskipun akurasi dan kisaran mungkin juga ditentukan tergantung pada sifat metode [22].

(3) Kategori III

Metode-metode yang digunakan untuk menetukan karakteristik kinerja produk akhir jatuh pada kategori III. Uji disolusi (tidak termasuk pengukurannya) dan uji-uji pelepasan obat merupakan contoh metode yang masuk kategori ini. Presisi merupakan parameter yang dipersyaratkan untuk kategori III ini, meskipun parameter-parameter validasi yang lain juga dapat ditentukan sesuai dengan tujuan yang diinginkan [22]. Elemen-elemen data yang dibutuhkan untuk uji validasi dapat dilihat pada Tabel V.

Tabel V. Elemen-elemen data yang dibutuhkan untuk uji validasi [22]

Parameter Kinerja Analisis	**Pengujian Kategori I**	**Pengujian Kategori II**		**Uji Kategori III**
		Kuantitatif	**Uji batas**	
Akurasi	Ya	Ya	*	*
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya
Spesifisitas	Ya	Ya	Ya	*
LOD	Tidak	Tidak	Ya	*
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	*
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*
Kisaran (range)	Ya	Ya	*	*
Ruggedness	Ya	Ya	Ya	Ya

*mungkin dibutuhkan, tergantung pada uji spesifiknya [22].

(4) Kategori IV

Uji identifkasi (*identification test*) dalam kategori IV hanya membutuhkan uji spesifisitas untuk validasinya [22]. Karakteristik validasi dan jenis prosedur analisisnya dapat dilihat pada Tabel VI.

Tabel VI. Karakteristik validasi dan jenis prosedur analisisnya [22]

Jenis Prosedur Analisis	Uji kemurnian			
	Identifikasi	**Kuantitatif**	**Uji Batas**	**Pengujian**
Akurasi	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Presisi				
Repeatibilitas	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Presisi antara	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Spesifisitas	Ya	Ya	Ya	Ya
LOD	Tidak	Tidak	Ya	Tidak
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Linieritas	Tidak	Ya	Tidak	Ya

c. Parameter validasi

(1) Ketepatan (akurasi)

Akurasi merupakan ukuran ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sempel. Untuk pengujian suatu senyawa obat, akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (*standart reference material*, SRM) [18].

$$\textit{Recovery}\ (\%) = \frac{C_F - C_A^*}{C_A} \times 100\ \%$$

Keterangan:

C_F : konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A : konsentrasi sampel sebenarnya

C^*_A : konsentrasi analit yang ditambahkan

(2) Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik [18].

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{n=i}(X_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

$$RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \text{ x } 100\ \%$$

Keterangan:
SD : standar deviasi
RSD : relatif standar deviasi
X : nilai dari masing-masing pengukuran
$\overline{X}$: rata-rata pengukuran
n : jumlah sampel

(3) Batas deteksi (*Limit of Detection*, LOD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blangko (y b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko (3Sb) [18].

LOD sering diekspresikan sebagai suatu konsentrasi pada rasio signal terhadap derau (*signal to noise ratio*) yang biasanya rasionya 2 atau 3 dibanding 1. ICH mengenalkan suatu metode *signal to noise ratio* ini, meskipun demikian ICH juga menggunakan 2 metode pilihan lain untuk menentukan LOD yaitu: metode non instrumental visual dan dengan metode perhitungan. Metode non instrumental visual digunakan pada KLT dan pada metode titrimetri. LOD juga dapat dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) rerspon dan kemiringan (*slope*, S) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus, LOD = 3,3 (SD/S). Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan

pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi [18].

$$LOD = 3{,}3.\frac{\frac{Sy}{x}}{b}$$

(4) Batas kuantitasi (*Limit of Quantitation*, LOQ)

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasai analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Definisi batas kuantitasi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas kuantitasi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blangko (y b) ditambah dengan 10 simpangan baku blanko (10Sb) [18].

$$LOQ = 10.\frac{\frac{Sy}{x}}{b}$$

(5) Linearitas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan [23].

B. Landasan Teori

Obat-obat TB yang dipergunakan dalam terapi biasanya dalam bentuk campuran obat, sehingga perlu upaya pemisahan terlebih dahulu sebelum dilakukan penentuan kadar. Obat TB dalam bentuk campuran (FDC rifampisin-INH) dapat dipisahkan dengan menggunakan metode HPLC yang diikuti dengan identifikasi kualitatif dan kuantitatif menggunakan detektor UV-Vis. Pada metode HPLC yang tercantum dalam USP, *running time* yang diperlukan untuk menganalisis satu sampel adalah 15 menit. Maka untuk mendapatkan waktu analisis yang singkat perlu dilakukan pengembangan metode analisis dari metode HPLC yang telah ada sehingga didapatkan suatu metode HPLC yang cepat, efektif dan efisien. Dalam hal ini pengembangan dilakukan dengan mengubah komposisi fase gerak sehingga mengubah nilai faktor retensi dari metode HPLC yang telah ada sehingga dapat mempercepat waktu retensi isoniazid dan rifampisin. Selain itu, pengembangan juga dilakukan dengan mengubah waktu transfer eluen dari eluan A ke eluen B yang pada awalnya dilakukan pada menit ke-5 diubah menjadi menit ke-4.

Rifampisin dan INH dapat diidentifikasi dengan menggunakan detektor UV-Vis karena memiliki gugus kromofor yang memungkinkan untuk dianalisis secara kuantitatif. Setiap metode yang mengalami modifikasi harus dilakukan upaya pembuktian kehandalannya sehingga perlu dilakukan proses validasi.

C. Hipotesis

Penelitian yang dilakukan menghasilkan suatu metode HPLC yang memiliki validitas yang baik yang dapat digunakan untuk menetapkan kadar obat TB FDC (rifampisin-INH), dan kadar yang terukur sesuai dengan kadar yang tertera pada kemasan dan memenuhi persyaratan yang tertera pada USP.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain asetonitril (kualitas kromatografi, E.Merck), dapar fosfat, NaOH (kualitas analisis, E.Merck), aquabidestillata, standar rifampisin (baku produksi 99,40 % *Certificate of Analysis*, CoA) dan standar isoniazid (INH baku produksi 99,60 % CoA) yang didapat dari PT. Sanbefarma, tablet FDC rifampisin-isoniazid (Rimactazid®) yang didapat dari PT. Sandoz Indonesia.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pipet tetes, pipet volum (Pirex), propipet, labu ukur (Pirex), gelas ukur (Pirex), erlenmeyer (Pirex), *beaker glass* (Pirex), neraca digital (Metler Toledo xs 205, kepekaan 0,01 mg), HPLC merk waters model e2695 yang dilengkapi dengan detektor UV-Vis waters 2489, kolom C18 25 cm x 4,60 mm, 5µm.

B. Cara Penelitian

1. Preparasi fase gerak

Larutan buffer : Sebanyak 1,4 gram serbuk natrium fosfat dibasa dimasukkan dalam labu takar 1 L dan dilarutkan dengan aquabidestillata hingga batas [6]. Kemudian larutan tersebut ditambah larutan NaOH 0,1 M hingga pH 6,8.

2. Preparasi larutan standar

Ditimbang seksama kurang lebih 10 mg standar INH dan 15 mg rifampisin dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml untuk membuat latutan baku 100/150 ppm. Standar INH dan rifampisin dilarutkan dengan eluen A sampai batas. Kemudian dari larutan baku tersebut dipipet 3, 5, 7 dan 9 ml masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan ditambah eluen A hingga batas untuk membuat larutan standar INH/rifampisin konsentrasi 30/45, 50/75, 70/105 dan 90/135 ppm. Sedangkan pembuatan larutan standar 110/165 ppm dilakukan dengan menimbang seksama kurang

lebih 11 mg standar INH dan 16,5 mg standar rifampisin dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu ditambahkan eluen A hingga batas.

3. Optimasi Kondisi Fase Gerak

Variasi komposisi fase gerak yang digunakan dalam optimasi eluen dapat dilihat pada Tabel VII.

Tabel VII. Variasi komposisi fase gerak yang digunakan dalam optimasi eluen [6]

No.	Kombinasi eluen yang digunakan	Perbandingan (%v/v)	
		Eluen A	Eluen B
1	Buffer fosfat : asetonitril	90 : 10	55 : 45
2	Buffer fosfat : asetonitril	96 : 4	57,5 : 42,5
3	Buffer fosfat : asetonitril	96 : 4	60 : 40
4	Buffer fosfat : asetonitril	96 : 4	62,5 : 37,5
5	Buffer fosfat : asetonitril	96 : 4	65 : 35

Sebanyak 20 µl larutan standar INH/rifampisin 50/75 ppm disuntikkan ke dalam kolom dengan laju alir 1,5 ml/menit disertai mekanisme elusi yang dapat dilihat pada tabel VIII

Tabel VIII. Mekanisme Elusi [6]

Waktu (menit)	Larutan A (%)	Larutan B (%)	Elusi
0	100	0	Equilibrasi
0-4	100	0	Isokratik
4-5	100 → 0	0 → 100	Gradien linier
5-10	0	100	Isokratik

4. Pembuatan Kurva Baku

Pembuatan kurva baku dilakukan dengan menginjeksi larutan standar 30/45, 50/75, 70/105, 90/135 dan 110/165 ppm sebanyak 20 µl kedalam kolom dengan kecepatan alir 1,5 ml/menit menggunakan elusi gradien pada panjang gelombang 238 nm dengan menggunakan fase gerak hasil optimasi.

5. Validasi Metode

a. Pengujian batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi metode (LOQ)

LOD dan LOQ ditentukan melalui kurva baku yang didapat. Nilai LOD setara dengan 3,3 X (Sy/x)/b sedangkan LOQ setara dengan 10 X (Sy/x)/b [18].

b. Pengujian presisi

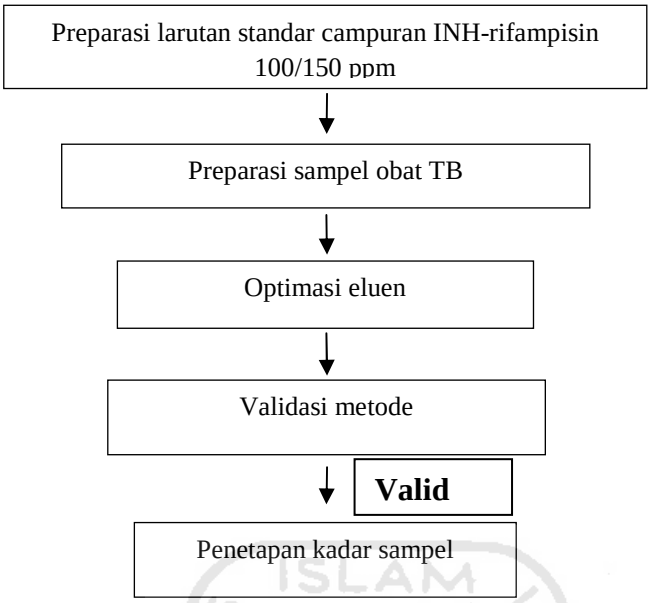
Sesuai rekomendasi AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) presisi yang harus dilakukan yaitu keterulangan (*repeatability*). *Repeatability* ditentukan sebagai variasi dalam sehari [10]. Kadar yang digunakan adalah 30/45 dan 110/165 ppm sebanyak 6 kali injeksi per replikasi. Data yang didapat adalah nilai Rf dan AUC. Dihitung nilai $\overline{X}$, SD dan RSD dari masing-masing replikasi.

c. Pengujian kecermatan (*recovery* atau akurasi)

Pengujian akurasi dilakukan dengan metode standar adisi. Sampel yang dianalisis adalah sampel rifampisin dan INH yang diperkirakan memiliki kadar 450/300 ppm. Sampel ditambahkan dengan tiga seri kadar yang berbeda yaitu 50/75, 70/105 dan 90/135 ppm yang masing-masing direpitasi sebanyak 3 kali. Persen akurasi ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan dapat ditemukan [21].

6. Penetapan kadar dari sampel

Tablet digerus menggunakan mortir kemudian ditimbang 0,03 gram sampel kemudian sampel dilarutkan dalam labu 100 ml dengan eluen A. Larutan tersebut diencerkan 2x, 1,43x dan1,11x. Sampel tersebut kemudian diinjeksikan kedalam HPLC sebanyak 20 µl dengan 3 kali repitasi. Didapatkan nilai AUC dari masing-masing replikasi, yang digunakan sebagai dasar penetapan kadar. Perhitungan kadar rifampisin dan INH dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva baku, y = bx + a, y = AUC sampel, b = slope, a = intersep dan x= kadar sampel. Skema penelitian secara umum dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Skema penelitian secara umum

C. Analisis Hasil

Analisis hasil validasi dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dengan persyaratan yang telah ditentukan dalam *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), sedangkan kadar rifampisin maupun INH yang terukur dibandingkan dengan standar yang tertera dalam *United States Pharmacopeia* (USP).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rifampisin-isoniazid merupakan kombinasi obat terpenting pada pengobatan TB [(1)] dengan durasi pemberiannya paling lama [(3)]. Penggunaannya yang luas dan dalam jangka waktu yang lama inilah yang menjadikannya sangat penting untuk dianalisis untuk menghindari adanya produk dibawah dosis di pasaran. *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan penggunaan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menganalisis kadar zat aktif yang terkandung dalam sediaan tersebut. Dalam penelitian ini metode HPLC dipilih karena lebih umum digunakan di Industri Farmasi maupun rumah sakit. Selain itu HPLC dipilih memiliki sensitivitas dan akurasi yang lebih baik dibandingkan KLT. Namun, metode HPLC yang ada sekarang memiliki waktu pengerjaan yang lama yakni sekitar 15 menit sehingga kurang efektif dan efisien [(6)].

Validasi merupakan suatu tahapan yang harus dilakukan untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sesuai untuk mencapai tujuan yang diinginkan. Validasi metode dilakukan untuk kontrol kualitas dari proses manufaktur dari produk tunggal yang diproduksi oleh produsen tunggal, memeriksa reliabilitas metode yang diambil dari sumber lain, perbedaan laboratorium tempat pelaksanaan metode serta metode yang multi-analit dan multi-matriks yang belum pernah dilakukan validasi antar-laboratorium. Penelitian kali ini termasuk penelitian kategori 1 sehingga parameter validasinya antara lain: linieritas, batas deteksi (*Limit of Detection*, LOD) dan batas kuantitasi (*Limit of Quantitation*, LOQ), presisi dan akurasi.

Apabila penelitian ini berhasil maka akan dihasilkan suatu metode yang valid dengan waktu analisis yang dapat diminimalkan, sehingga dapat menghemat biaya karena menurunkan jumlah penggunaan fase gerak dan daya. Dalam rangka mewujudkan hal tersebut, serangkaian proses penelitian yang panjang dan membutuhkan tingkat ketelitian yang tinggi harus dijalankan. Proses tersebut didahului dengan proses optimasi, dilanjutkan proses validasi dan diakhiri dengan penetapan kadar.

A. Optimasi Eluen (Fase Gerak)

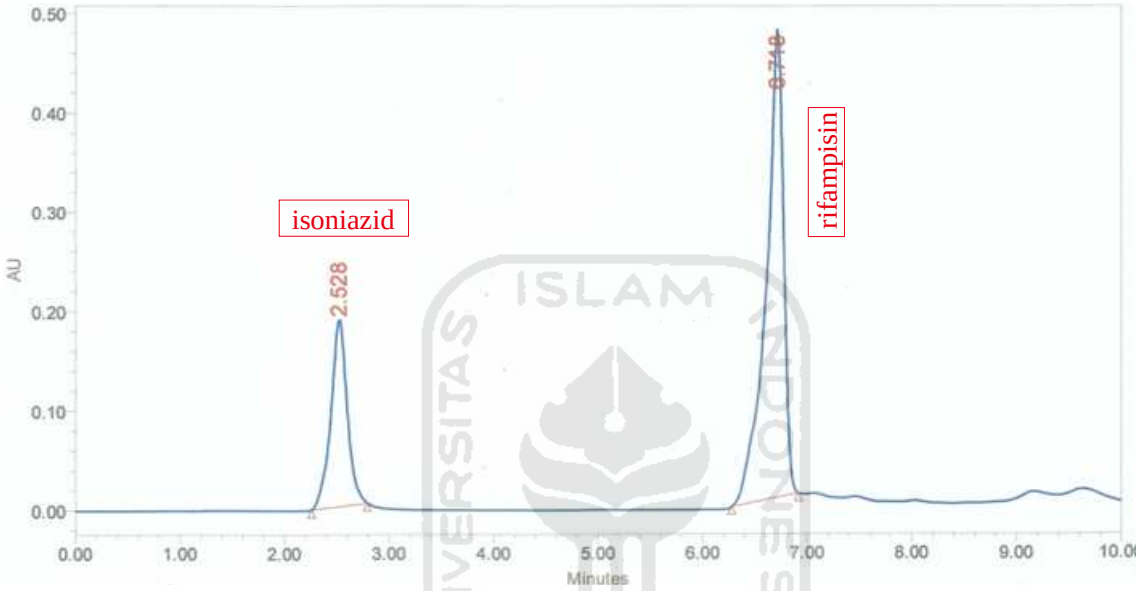
Optimasi eluen bertujuan untuk mengetahui eluen yang terbaik untuk memisahkan senyawa-senyawa yang diuji. Dalam penelitian ini senyawa yang ingin dipisahkan adalah rifampisin dan INH. Proses ini merupakan tahap awal yang sangat menentukan langkah penelitian selanjutnya. Apabila optimasi eluen berhasil dengan baik maka senyawa dapat terpisah dengan sempurna dan menghasilkan kromatogram yang baik. Hal ini sangat menentukan analisis kualitatif maupun kuantitatif yang akan dilakukan selanjutnya.

Dalam proses optimasi eluen pada HPLC, prinsip *like dissolved like* sangatlah menentukan. *Like dissolved like* secara sederhana dapat diartikan bahwa senyawa dengan tingkat polaritas yang sama dengan eluen akan saling tarik menarik, sedangkan apabila tingkat polaritas berbeda maka akan saling tolak menolak. Dalam HPLC terjadi suatu interaksi antara eluen, fase diam dan senyawa yang ingin dianalisis (analit). Mengacu pada prinsip ini, maka analit yang berinteraksi kuat dengan eluen, akan terelusi dengan cepat begitu pula sebaliknya. Interaksi ini juga menentukan bentuk kromatogram yang dihasilkan. Senyawa-senyawa yang memiliki interaksi yang lemah dengan fase gerak, maka akan menghasilkan puncak kromatogram yang melebar (*tailing*) [(18)].

Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah *oktadesil silika* (C-18). *Oktadesil silika* merupakan jenis fase diam yang paling umum digunakan untuk pemisahan senyawa-snyawa obat karena sifatnya yang nonpolar [(18)]. Eluen yang digunakan dalam penelitian ini merupakan campuran dua larutan yakni dapar fosfat dan asetonitril dengan perbandingan yang berbeda. Perbedaan perbandingan inilah yang membedakan polaritas dari fase gerak.

Selain mengetahui sifat kepolaran dari fase diam dan eluen, selanjutnya sifat dari analit juga perlu diperhatikan. Rifampisin dan INH apabila dilihat menurut tingkat kelarutannya dalam air, maka INH lebih mudah larut dalam air, sedangkan untuk kelarutan pada senyawa-senyawa semi polar seperti alkohol dan aseton, rifampisin lebih mudah larut. Sehingga pada eluen A fase gerak yang dominan adalah dapar, maka INH

yang akan terelusi terlebih dahulu. Sedangkan untuk eluen B fase gerak yang dominan adalah asetonitril yang sifatnya semi-polar maka senyawa yang terelusi lebih dahulu adalah rifampisin. Oleh karena itu dengan tipe elusi gradien yang diterapkan, maka senyawa yang muncul terlebih dahulu adalah INH dan kemudian disusul oleh rifampisin.



Gambar 5. Hasil elusi dengan menggunakan eluen 3 dengan eluen A perbandingan dapar fosfat : asetonitril 96:4 dan eluen B perbandingan dapar fosfat : asetonitril 60:40, kolom C18, detektor UV-VIS, kecepatan alir 1,5 ml/menit, elusi gradien, panjang gelombang 238 nm**.**

Hasil optimasi eluen yang dapat dilihat pada menunjukkan INH terelusi lebih dahulu dibandingkan dengan rifampisin. Berdasarkan hasil tersebut, sementara ini disimpulkan bahwa komposisi terbaik untuk eluen A dengan perbandingan dapar fosfat dan asetonitril adalah 96:4 sedangkan untuk eluen B perbandingan dapar fosfat dan asetonitril adalah 60:40 (gambar 5).

Hasil pemisahan dengan eluen terbaik, menunjukan profil pemisahan yang baik dengan nilai resolusi yang tinggi dan bentuk puncak yang lancip. Profil pemisahan yang baik dengan nilai resolusi yang tinggi akan memudahkan peneliti dalam mengidentifikasi keberadaan rifampisin maupun INH tanpa takut adanya senyawa yang masih menyatu. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan memiliki nilai resolusi yang sangat baik yakni 14,58, jauh diatas batas minimal resolusi

yang disarankan oleh FDA yakni minimal 2 untuk pemisahan senyawa semua bahan aktif obat termasuk produk degradasinya [18]. Tetapi nilai efisiensi kolom dari isoniazid dan rifampisin tidak memenuhi syarat yang ditetapkan oleh USP yakni tidak kurang dari 6000 untuk isoniazid dan tidak kurang dari 50000 untuk rifampisin [10]. Hal ini karena penelitian ini terlalu fokus pada teknik mempersingkat waktu analisis sehingga waktu retensi menjadi lebih kecil yang menyebabkan menurunnya nilai efisiensi kolom. Dengan pengubahan komponen fase gerak, terjadi perubahan koefisien distribusi senyawa. Senyawa menjadi lebih mudah terdistribusi dalam fase gerak sehingga menjadi lebih cepat terbawa menuju detektor. Hal inilah yang menyebabkan waktu retensi senyawa menjadi lebih cepat. *Running time* juga menjadi lebih cepat dibandingkan metode standar, dari 15 menit menjadi hanya 10 menit. Dibandingkan metode yang lain, metode yang telah dikembangkan ini lebih cepat karena metode yang lain memiliki waktu retensi minimal 13 menit [7] [8]. Selain itu metode ini hanya menggunakan detektor UV-Vis yang lazim dimiliki oleh industri farmasi dibandingkan dengan detektor spektra massa [7]. Meskipun ada metode HPLC yang memiliki waktu retensi hanya 1,5 menit [9] tetapi metode ini menggunakan kromatografi cair tekanan sangat tinggi dengan kolom yang baru dengan diameter dan panjang kolom yang lebih kecil serta ukuran partikel fase diam yang lebih kecil pula. Selain faktor komposisi fase gerak, selama proses pengerjaan ternyata diketahui bahwa faktor temperatur kolom juga mempengaruhi puncak analit (rifampisin). Pada saat rifampisin diinjeksikan kedalam kolom yang bertemperatur 27^0C dengan eluen A dapar fosfat dan asetonitril (96:4) dan eluen B dapar fosfat dan asetonitril (60:40) akan dihasilkan puncak seperti gambar 8. Akan tetapi ketika rifampisin diinjeksikan kedalam kolom yang bertemperatur diatas 27^0C maka akan terjadi 2 puncak yang dimungkinkan merupakan produk degradasi rifampisin karena rifampisin sangat mudah terdegradasi oleh cahaya dan panas sehingga harus disimpan dalam suhu dibawah 25^0C dan dalam wadah yang terlindung dari cahaya [6].

Tabel IX. Parameter uji kesesuaian sistem

Parameter	Nilai	Standar	Keterangan
Efisiensi (N) INH	897,02	≥ 6000	Tidak memenuhi syarat
Efisiensi (N) rifampisin	1175,35	≥ 50000	Tidak memenuhi syarat
Resolusi (R)	14,58	≥ 1,5	Memenuhi syarat
Selektivitas (α)	0,37	-	-

Keterangan : perhitungan parameter uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada lampiran 4

B. Validasi Metode

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode menurut USP dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reprodusibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis [(21)]. Metode HPLC ini perlu divalidasi karena metode ini mengalami modifikasi dari metode yang telah ada, sehingga diperlukan serangkaian percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan dalam penggunaannya. Parameter-parameter yang harus diuji antara lain: linieritas, LOD, LOQ, presisi dan akurasi.

1. Kurva Baku

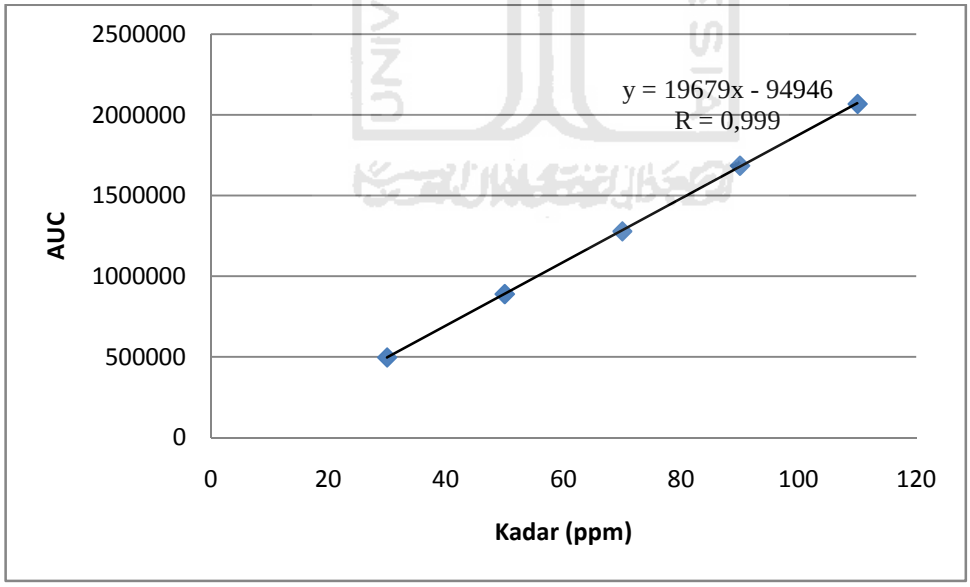
Kurva baku merupakan suatu kurva yang dibuat dengan membandingkan antara konsentrasi seri kadar dengan AUC-nya. Melalui kurva baku, dapat diketahui linieritas dari metode yang digunakan. Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analis pada kisaran yang diberikan. Linieritas dikatakan baik apabila nilai r-nya mendekati satu (0,999) [(18)].

Apabila nilai r-nya kurang dari 0,999 masih bisa dikatakan baik apabila nilai Vxo-nya kurang dari 5 % [(21)]. Vxo merupakan suatu parameter lain untuk mengetahui linearitas suatu metode, dengan mengukur kedekatan nilai AUC yang terukur oleh detektor dengan AUC yang didapat dari perhitungan persamaan kurva baku. Dengan demikian semakin kecil nilai Vxo maka semakin dekat pula AUC antara yang terukur pada detektor dengan perhitungan persamaan kurva baku.

Pada proses pembuatan kurva baku, dibuat seri kadar campuran dengan konsentrasi 30, 50, 70, 90 dan 110 ppm untuk INH, sedangkan 45, 75, 105, 135, dan 165 ppm untuk rifampisin. Hasil kurva baku dari INH dapat dilihat pada Gambar 14 dan Tabel X, sedangkan rifampisin pada Gambar 6 dan Tabel XI.

Tabel X. Kurva baku INH

No.	Kadar (ppm)	AUC
1.	30	496272,16
2.	50	888734,85
3.	70	1277240,56
4.	90	1684241,50
5.	110	2066413,69



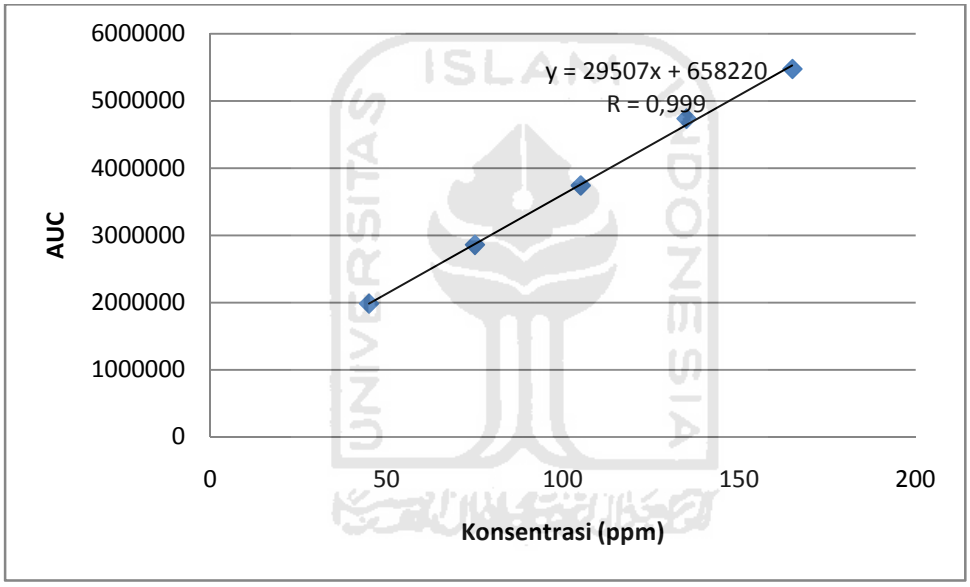
Gambar 6. Kurva baku INH.

Linearitas pada kurva baku dihitung dengan membandingkan antara konsentrasi senyawa dan nilai AUC. Untuk mendapatkan nilai linearitas maka nilai antara kadar dan AUC dimasukkan dalam persamaan regresi linear. Berdasarkan perhitungan regresi

linear diketahui bahwa INH mempunyai regresi 0,999. Nilai koefisien regresi ini menunjukkan bahwa INH mempunyai linearitas yang baik.

Tabel XI. Kurva baku rifampisin

No.	Kadar (ppm)	AUC
1	45	1983007,24
2	75	2856502,89
3	105	3739497,49
4	135	4732279,32
5	165	5471234,25



Gambar 7. Kurva baku rifampisin.

Berdasarkan pengukuran rifampisin dalam Tabel XII diketahui nilai r yaitu 0,999.

Tabel XII. Nilai linieritas INH dan rifampisin berdasarkan nilai r DAN V_{x0}

No.	Nama senyawa obat	Persamaan Kurva Regresi Linier	Nilai r	Nilai V_{x0}	Keterangan
1.	INH	Y = 19679x – 94946	0,999	0,43	Memenuhi syarat
2.	Rifampisin	Y = 29507x + 658220	0,999	2,03	Memenuhi syarat

Berdasarkan hasil yang tertera pada Tabel XII menunjukkan bahwa INH dengan rentang kurva baku 30 sampai 110 ppm dijamin linieritasnya dengan nilai r 0,999. Rifampisin dengan rentang kurva baku 45 sampai 165 ppm dijamin linieritasnya dengan nilai r 0,999 . Dengan demikian apabila digunakan untuk menghitung kadar sampel dengan kandungan INH dan rifampisin yang masuk pada *range* tersebut, dapat dijamin validitasnya, sedangkan apabila digunakan untuk menghitung kadar diluar dari *range* tersebut, maka tidak dijamin validitasnya. Berdasarkan uraian di atas disimpulkan bahwa linieritas dari INH maupun rifampisin sama-sama memenuhi persyaratan, sehingga metode ini dapat dikatakan valid.

2. Batas deteksi (*Limit of Detection*, LOD) dan batas kuantitasi (*Limit of Quantitation*, LOQ)

LOD didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantitasi. LOQ didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan [(18)]. LOD dan LOQ menunjukkan kesensitifan suatu metode, karena semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif pula metode tersebut begitu pula sebaliknya.

Pada penelitian kali ini perhitungan nilai LOD dan LOQ tidak dihitung dengan mengukur respon blanko. LOD dan LOQ dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva baku. Nilai pengukurannya akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier y = a + bx, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x) [(18)]. Setelah dilakukan penelitian, didapatkan nilai LOD dan LOQ seperti yang tertera pada Tabel XIII.

Tabel XIII. Nilai LOD-LOQ senyawa INH dan rifampisin

No.	Nama senyawa	Nilai LOD (ppm)	Nilai LOQ (ppm)
1.	INH	1,00	3,02
2.	Rifampisin	7,02	21,27

Keterangan: perhitungan LOD dan LOQ rifampisin dan INH dapat dilihat pada lampiran 5

Berdasarkan Tabel XIII dapat diketahui bahwa metode HPLC dapat mendeteksi keberadaan INH dalam sampel apabila kadar yang terkandung di dalam sampel lebih dari sama dengan 1,00 ppm. Untuk kadar INH terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode ini adalah 3,02 ppm. Metode HPLC dapat mendeteksi keberadaan rifampisin dalam sampel apabila kadar yang terkandung didalam sampel lebih dari sama dengan 7,02 ppm. Untuk kadar rifampisin terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode ini adalah 21,27 ppm.

Nilai tersebut diatas menunjukkan bahwa LOD dan LOQ dari INH lebih kecil dibandingkan dengan rifampisin. Hal ini dapat diartikan bahwa metode HPLC yang dikembangkan lebih sensitif terhadap INH, apabila dibandingkan dengan rifampisin. Sehingga apabila diaplikasikan dalam sampel, kandungan INH memang lebih kecil dibandingkan dengan rifampisin, maka tidak perlu diragukan validitasnya.

3. Presisi (keseksamaan)

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik [(18)]. Presisi juga dapat diartikan sebagai ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen [(21)].

Presisi yang dilakukan yaitu presisi dalam satu hari (*repeatability* atau *intraday precision)*. Kadar yang dipilih adalah 30 dan 110 ppm untuk INH sedangkan untuk rifampisin kadar yang digunakan adalah 45 dan 165 ppm. Kedua konsentrasi tersebut

diinjek sebanyak enam kali. Kedua kadar ini dipilih karena untuk mewakili kadar terkecil dan terbesar pada seri kadar INH dan Rifampisin. Menurut *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) pada kadar 10-100 ppm, presisi dianggap memenuhi persyaratan apabila RSD tinggi dan RSD AUC-nya kurang dari 6 % [10]. Berikut nilai presisi dari rifampisin dan INH yang disajikan pada Tabel XV.

Tabel XIV. Nilai presisi AUC INH dan rifampisin

No.	INH		Rifampisin	
	30 ppm	**110 ppm**	**45 ppm**	**165 ppm**
1.	543888	2032515	1716012	5449141
2.	544061	2038334	1713632	5450382
3.	542134	2036900	1697574	5441689
4.	541407	2035887	1730291	5446432
5.	542036	2033314	1720843	5447454
6.	542945	2034040	1713828	5445830
$\overline{X}$	542745,17	2035165	1715363,33	5446821,33
SD	1071,87	2248,93	10724,72	3030,99
RSD	0,20	0,11	0,63	0,06

Keterangan: Contoh perhitungan presisi AUC INH dan rifampisin dapat dilihat pada lampiran 6

Tabel XV. Nilai presisi waktu retensi INH dan rifampisin

No.	INH		Rifampisin	
	30 ppm	**110 ppm**	**45 ppm**	**165 ppm**
1.	2,54	2,53	6,68	6,72
2.	2,53	2,53	6,70	6,72
3.	2,53	2,52	6,71	6,73
4.	2,54	2,53	6,71	6,71
5.	2,54	2,53	6,69	6,70
6.	2,54	2,51	6,70	6,72
$\overline{X}$	2,54	2,53	6,70	6,72
SD	0,01	0,01	0,01	0,01
RSD	0,15	0,30	0,16	0,15

Tabel XIV dan XV menunjukkan bahwa kedua standar sama-sama memenuhi persyaratan presisi yang baik menurut AOAC [7] dan USP [6]. Nilai presisi menunjukkan metode tersebut dalam pengukuran kadar yang sama apabila dilakukan pengulangan

pengukurannya maka hasilnya tidak akan terlalu berbeda. Hal ini membuat metode HPLC yang telah dimodifikasi merupakan metode yang valid karena nilai presisinya memenuhi persyaratan.

Nilai presisi INH kadar 30 ppm lebih baik bila dibandingkan dengan nilai presisi dari rifampisin kadar 45 ppm. Sedangkan untuk nilai presisi rifampisin 165 ppm lebih baik dibandingkan dengan nilai presisi INH 110 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini sangat baik untuk menganalisis INH dalam kadar yang kecil dan rifampisin dalam kadar yang besar.

4. Akurasi (perolehan kembali)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan [(15)]. Pada penelitian kali ini digunakan metode standar adisi. Metode ini dipilih karena tidak diketahui matriks apa yang digunakan dalam sampel. Sehingga tidak memungkinkan untuk membuat matriks yang bebas analit untuk menjadi dasar penetapan akurasi. Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen akurasi ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan dapat ditemukan [(21)].

Pada proses akurasi kali ini peneliti menggunakan tiga macam seri kadar yang berbeda yang akan ditambahkan dalam sampel. Seri kadar tersebut adalah 50, 70, dan 90 ppm untuk INH sedangkan untuk rifampisin seri kadar yang ditambahkan adalah 75, 105 dan 135 ppm. Digunakannya tiga seri kadar yang berbeda untuk mengetahui nilai akurasi yang didapat apabila konsentrasi standar yang ditambahkan berbeda-beda. Menurut AOAC, nilai akurasi yang baik untuk kadar 10-100 ppm adalah 80-115 % [(10)]. Penelitian yang dilakukan menghasilkan nilai akurasi INH seperti yang tertera pada Tabel XVI, sedangkan nilai akurasi rifampisin tertera pada Tabel XVII.

Tabel XVI. Nilai akurasi senyawa INH pada tiga seri kadar yang berbeda

No.	Kadar sampel + standar (ppm)	Kadar terukur (ppm)	Akurasi (%)	Rata-rata (%)
1.	50	49,68	99,37	99,92
2.		50,04	100,09	
3.		50,15	100,31	
4.	70	69,33	99,04	99,03
5.		69,39	99,13	
6.		69,25	98,93	
7.	90	86,46	96,06	96,14
8.		86,48	96,08	
9.		86,64	96,26	

Tabel XVII. Nilai akurasi senyawa rifampisin pada tiga seri kadar yang berbeda

No.	Kadar sampel + standar (ppm)	Kadar terukur (ppm)	Akurasi (%)	Rata-rata (%)
1.	75	71,05	94,74	95,47
2.		72,07	96,09	
3.		71,69	95,58	
4.	105	104,63	99,65	99,33
5.		104,97	99,97	
6.		103,28	98,36	
7.	135	128,44	95,14	94,35
8.		126,78	93,91	
9.		126,88	93,99	

Contoh perhitungan akurasi INH dan rifampisin dapat dilihat pada lampiran 7

Berdasarkan Tabel XVI dan XVII dapat diketahui bahwa nilai akurasi INH dan rifampisin dari ketiga seri yang ada, semua memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan oleh AOAC. Secara garis besar metode HPLC yang dimodifikasi ini dapat dikatakan valid. Validitas dapat dijamin secara akurasi karena dari ketiga seri penambahan kadar yang ada kesemuanya menunjukkan kadar yang baik. Hasil akurasi yang baik menunjukkan bahwa metode yang digunakan dapat mengukur analit pada kadar yang sebenarnya secara valid. Apabila suatu metode dapat mengukur kadar secara valid (sesuai dengan kadar yang sebenarnya), maka apabila digunakan untuk mengukur kadar dalam sampel pun, hasilnya dapat dipertanggungjawabkan.

Berdasarkan serangkaian proses validasi yang dilakukan, disimpulkan bahwa metode HPLC yang dimodifikasi valid untuk menganalisis kadar rifampisin dan INH yang ada dalam sediaan obat TB FDC. Hal ini disebabkan hasil validasi yang dilakukan

menunjukkan bahwa semua parameter validasi memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh AOAC.

5. Penetapan Kadar

Pengukuran kadar merupakan tahap akhir yang dilakukan dalam penelitian, setelah hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang akan digunakan valid. Metode yang valid akan menghasilkan pengukuran yang sesuai dengan kadar yang sebenarnya. Hal ini akan menguatkan pada saat menyimpulkan hasil penelitian. Pengukuran kadar sampel dilakukan dengan memasukkan AUC sampel rata-rata yang didapat, ke dalam persamaan kurva baku. Pengukuran kadar yang dilakukan, menghasilkan data seperti tertera pada Tabel XVI dan XVII.

Berdasarkan Tabel XVIII dan XIX diketahui bahwa kadar rata INH yang terukur dalam sampel X sebesar 98,32 % sedangkan untuk rifampisin 95,93 %. Nilai tersebut menyatakan bahwa kadar INH dan rifampisin yang terdapat dalam sediaan obat TB FDC memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh WHO [5] dan juga memenuhi persyaratan yang tertera dalam USP yaitu pada range 90-110 %,[6].

Tabel XVIII. Pengukuran kadar INH dalam sampel

No	Sampel	Kadar INH terukur (mg)	Rata-rata (%)
1.	Sampel 1	300,46	100,04
2.		299,95	
3.		299,90	
4.	Sampel 2	297,11	99,03
5.		297,40	
6.		296,79	
7.	Sampel 3	288,25	95,90
8.		287,68	
9.		287,15	

Tabel XIX. Pengukuran kadar rifampisin dalam sampel

No.	Sampel	Kadar rifampisin terukur (mg)	Rata-rata (%)
1.	Sampel 1	425,71	94,62
2.		425,60	
3.		426,04	
4.	Sampel 2	444,23	99,21
5.		446,84	
6.		448,31	
7.	Sampel 3	421,78	93,94
8.		423,70	
9.		422,74	

Keterangan: perhitungan pengukuran kadar rifampisin dan INH dalam sampel dapat dilihat pada lampiran 8

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Metode HPLC untuk menganalisis campuran isoniazid dan rifampisin dalam obat anti-tuberkulosis dapat dimodifikasi yakni dengan mengubah waktu transfer eluen A ke eluen B dari menit ke-5 menjadi menit ke-4 dan mengubah komposisi eluen B dari dapar fosfat:asetonitril 55:45 menjadi 60:40 untuk mempercepat proses analisis dari 15 menit menjadi 10 menit. Selain itu untuk memperoleh hasil yang baik, temperatur kolom harus dijaga pada 27^0C.
2. Berdasarkan parameter-parameter validasi yang telah diuji yakni linearitas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ, metode HPLC yang dimodifikasi memiliki validitas yang baik karena semua parameter validasi yang dilakukan memenuhi persyaratan yang ditetapkan AOAC dan USP.
3. Kadar INH dan rifampisin dalam sediaan FDC obat TB sesuai dengan standar yang tertera dalam USP yakni 100,04%, 99,03% dan 95,97% untuk INH dan 94,62%, 99,21% dan 93,94% untuk rifampisin.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian terkait stabilitas rifampisin dalam larutan buffer agar menghasilkan puncak yang lebih sempurna bentuknya.
2. Perlu dilakukan penelitian terkait pengaruh temperatur kolom terhadap stabilitas rifampisin.

DAFTAR PUSTAKA

(1) Peloquin, C.A, 2007, Tuberculosis, in Dipiro, J.T. (Ed.7). *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach Ed 7*, McGraw-Hill Companies, Inc, New York.

(2) Anonim, 2011, Global Tuberculosis Control 2011, *WHO Report*, Genewa, 9-11.

(3) Anonim, 2002, *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1-14.

(4) Laserson, K. F., Kenyon, A. S., Kenyon, T. A., Layloff, T., Binkin, N. J., 2001, Substandard tuberculosis drugs on the global market and their simple detection, *Int J Tuberc Lung Dis* : 448-54.

(5) Anonim, 2007, Rifampisin, Isoniazid, Pyrazinamide and Ethambutol Hydrochloride Tablets, Final text for addition to The International Pharmacopoeia, *WHO Report*, Genewa, 3.

(6) Anonim, 2009, *United State Pharmacopoeia 32-National Formulary 27*, USA, 3505.

(7) Fang, P.F., Cai, H.L., Li, H.D., Zhu, R.H., Tan, Q.Y., Gao, W., Xu, P., Liu, Y.P., Zhang, W.Y., Chen, Y.C., Zhan, F., 2010, Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, levofloxacin in mouse tissues and plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 878: 2286–2291.

(8) Tatarczak, M., Flieger, J., Szumilo, H., 2005, High Performance Liquid-Chromatographic Determination of Rifampicin in Complex Pharmaceutical Preparation and in Serum Mycobacterium Tuberculosis-infected Patients, *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research*, Vol. 62; 4: 251-256.

(9) Bounoshita, M., Miyaji, T., Okamura, K., Iwaya, K., Zamaguchi, T., Higashidate, S., Saito, S., 2006, *High Speed Separation of a Tuberculosis Medication Using Extreme High Pressure Liquid Chromatography (X-LC)*, available at http://www.jascoinc.com ,(diakses 25 Desember 2011).

(10) Anonim, 2002, *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, available at http://www.AOAC.org, (diakses 10 Oktober 2011).

(11) Anonim, 2009, Mycobacterium tuberculosis, *Wikipedia Foundation Inc*., available at http://www. wikipedia.org (diakses 15 Oktober 2011).

(12) Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, alih bahasa Edi Nugroho dan R.F. Maulany, Edisi 20, EGC, Jakarta, 302-304.

(13) Sweetman, 2009, *Martindale: The Complete Drug Reference, edisi 36,Volume I*, Pharmaceutical Press, London, 325.

(14) Liu, J., Jin, S., Zhang, W., Gao, K., He, Z., 2008, HPLC Determination of Rifampicin and Related Compounds in Pharmaceuticals Using Monolithic Column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46*: 405–409.

(15) Kumar, A. K. H., Chandra, I., Geetha, R., Chelvi, K. S., Lalitha, V., Prema, G., 2003, A Validated High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Rifampicin and Desacetyl Rifampicin in Plasma and Urine, *Ind. J Pharmacol*, Vol 36; 4:231-233.

(16) Lacy, C. F., Amstrong, L. L., Goldman, M. P., Lance, L. L., 2008, *Drug Information Handbook*, 17th edition, Lexi-comp, USA.

(17) Pratiwi, S. T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Erlangga, Jakarta, 156.

(18) Rohman, A, 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Belajar, Yogyakarta, 378-394, 460-469.

(19) Meyer, V. R., 2004, *Practical High-Performance Liquid Chromatography, Edisi 4*, John Wiley and Sons Inc., USA, 52-222.

(20) Kealey, D., dan Haines, P. J., 2002, Instant Notes: Analytical Chemistry, dalam Rohman, Abdul, 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 384 – 389.

(21) Harminta, 2004, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*, Departemen Farmasi FMIPA-UI, Jakarta, 117-134.

(22) Rohman, A, 2009, *Kromatografi untuk Analisis Obat*, Graha Ilmu, Yogyakarta, 217-222.

(23) Swartz, M.E., and Krull, I.S., 1997, *Analytical Method Development And Validation*, Marcel Decker Inc, New York, 65.

Lampiran 1: Perhitungan pengenceran seri kadar kurva baku campuran INH dan rifampisin

M1 x V1 = M2 x V2

Keterangan: M1 : konsentrasi Stok INH-Rifampisin(100/150 ppm)

V1 : volume yang dicari

M2 : konsentrasi seri kadar yang diinginkan

V2 : volume seri kadar yang ingin dibuat (10 ml)

Kadar 30/45 ppm: M1 x V1 = M2 x V2

100/150 ppm x V1 = 30/45 ppm x 10 ml

V1= 3 ml → ad eluen A 10ml

Kadar 50/75 ppm: M1 x V1 = M2 x V2

100/150 ppm x V1 = 50/75 ppm x 10 ml

V1= 5 ml → ad eluen A 10 ml

Kadar 70/105 ppm: M1 x V1 = M2 x V2

100/150 ppm x V1 = 70/105 ppm x 10 ml

V1= 7 ml → ad eluen A 10 ml

Kadar 90/135 ppm: M1 x V1 = M2 x V2

100/150 ppm x V1 = 90/135 ppm x 10 ml

V1= 9 ml → ad eluen A 10 ml

Kadar 110/165 ppm: ditimbang 11 mg isoniazid dan 16,5 mg rifampisin, dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml. Kemudian dilarutkan dengan eluen A hingga batas.

Lampiran 2: Perhitungan stok pembuatan sampel 100 / 150 ppm (INH/rifampisin)

Bobot per tablet = 0,994 gram = 994 mg

Kandungan INH 300 mg dan rifampisin 450 mg per tablet

Apabila dibuat dalam labu 100 ml:

INH 100 ppm = 100 gram / 10^6 ml

= 100 . 10^3 mg / 10^6 ml

= 10 mg / 100 ml

Rifampisin 150 ppm = 150 gram / 10^6 ml

= 150 . 10^3 mg / 10^6 ml

= 15 mg / 100 ml

Sampel yang harus ditimbang:

Berdasarkan perhitungan INH $= \frac{10\,mg}{300\,mg}$ x 994,2 mg = 33,14 mg

Berdasarkan perhitungan rifampisin $= \frac{15\,mg}{450\,mg}$ x 994,2 mg = 33,14 mg

} Hasil sama

Sehingga sampel yang harus ditimbang untuk menghasilkan larutan sampel dengan konsentrasi 100 ppm INH dan 150 ppm rifampisin adalah sebanyak 33,14 mg atau setara dengan 0,03 gram

Lampiran 3: Perhitungan nilai Vxo INH dan rifampisin

$$Vxo = \frac{\frac{Sy}{x}}{b.\bar{x}} \longrightarrow \frac{Sy}{x} = \sqrt{\frac{\sum (Yr - Yi)^2}{n - 2}}$$

1. INH:

No	X	Yr	Yi	(Yr-Yi)	(Yr-Yi)2	Σ (Yr-Yi)2	Σ (Yr-Yi)2 / (n-2)	Sy/x	Vxo (%)
1	30	496272,16	495424	848,16	719366,90	105681057,40	35227019,14	5935,24	0,43
2	50	888734,85	889004	-269,15	72439,57				
3	70	1277240,56	1282584	-5343,44	28552318,97				
4	90	1684241,50	1676164	8077,50	65245973,94				
5	110	2066413,69	2069744	-3330,31	11090958,04				
$\bar{X}$	70								
B	19679								
n-2	3								

Lampiran 3 (lanjutan)

2. Rifampisin:

No	X	Yr	Yi	(Yr-Yi)	(Yr-Yi)2	Σ (Yr-Yi)2	Σ (Yr-Yi)2 / (n-2)	Sy/x	Vxo (%)
1	45	1983007,24	1986035	-3027,76	9167342,73	11820902669	3940300890	62771,82	2,03
2	75	2856502,89	2871245	-14742,12	217329954,70				
3	105	3739497,49	3756455	-16957,51	287557281,10				
4	135	4732279,32	4641665	90614,32	8210954808				
5.	500	15900,90	15855	45,90	2106,81				
$\overline{X}$	105								
B	29507								
n-2	3								

Keterangan:

$\overline{x}$ = rata – rata

b = slope

n = jumlah seri kadar

Lampiran 4: Perhitungan parameter uji kesesuaian sistem

Diketahui:

t_R INH : 4,22 cm

t_R rifampisin : 11,39 cm

Wb INH : 0,56 cm

Wb rifampisin : 0,42 cm

t_M : 16,92 cm

$N_{INH} = 16 \left(\frac{tR\ INH}{Wb\ INH}\right)^2$

$= 16 \left(\frac{4,22}{0,56}\right)^2$

$= 897,02$

$N_{rifampisin} = 16 \left(\frac{tR\ rifampisin}{Wb\ rifampisin}\right)^2$

$= 16 \left(\frac{11,39}{0,42}\right)^2$

$= 11775,35$

$Rs = \frac{2x\Delta tR}{(Wb\ INH + Wb\ rifampisin)}$

$= \frac{2x\ (11,39-4,22)}{(0,56+0,42)}$

$= 14,58$

$\alpha = \frac{tR\ INH - tM}{tR\ rifampisin - tM}$

$= \frac{4,22-0}{11,39-0}$

$= 0,37$

Lampiran 5: Perhitungan LOD dan LOQ INH-Rifampisin

$$LOD = 3{,}3.\frac{\frac{Sy}{x}}{b} \longrightarrow LOQ = 10.\frac{\frac{Sy}{x}}{b}$$

1. INH:

   $LOD = 3{,}3 \times \frac{5935{,}24}{19679} = 1{,}00 \text{ ppm}$

   $LOQ = 10 \times \frac{5935{,}24}{19679} = 3{,}02 \text{ ppm}$

2. Rifampisin:

   $LOD = 3{,}3 \times \frac{62771{,}82}{29507} = 7{,}02 \text{ ppm}$

   $LOQ = 10 \times \frac{62771{,}82}{29507} = 21{,}27 \text{ ppm}$

Lampiran 6: Perhitungan presisi INH dan rifampisin

$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2 + ... + X_n}{n} \rightarrow$ SD = $\sqrt{\frac{\sum (X - \overline{X})^2}{n-1}} \rightarrow$ RSD = $\frac{SD}{\overline{X}}$ x 100%

1. INH 30 ppm:

   Contoh perhitungan presisi AUC 30 ppm

   $\overline{X} = \frac{543888+544061+542134+541407+542036+542945}{6} = 542745,17$

   SD=

   $\sqrt{\frac{(543888-542745,17)^2 + (544061-542745,17)^2 + ... + (542945-542745,17)^2}{6-1}}$

   = 1071,87

   RSD = $\frac{1071,87}{542745,17}$ x 100% = 0,20 %

2. INH 110 ppm:

   Contoh perhitungan presisi AUC 110 ppm

   $\overline{X} = \frac{2032515+2038334+2036900+2035887+2033314+2034040}{6} = 2035165$

   SD=

   $\sqrt{\frac{(2032515-2035165)^2 + (2038334-2035165)^2 + ... + (2034040-2035165)^2}{6-1}}$

   = 2248,93

   RSD = $\frac{2248,93}{2035165}$ x 100% = 0,11 %

Lampiran 6 (lanjutan)

3. Rifampisin 45 ppm:

   Contoh perhitungan presisi AUC 45 ppm

   $$\overline{X} = \frac{1716012+1713632+1697574+1730291+1720843+1713828}{6} = 1715363,33$$

   SD=

   $$\sqrt{\frac{(1716012-1715363,33)^2+(1713632-1715363,33)^2+...+(1713828-1715363,33)^2}{6-1}}$$

   = 10724,72

   RSD = $\frac{10724,72}{1715363,33}$ x 100% = 0,63 %

4. INH 165 ppm:

Presisi	1716012	5449141
	1713632	5450382
	1697574	5441689
	1730291	5446432
	1720843	5447454
	1713828	5445830
X	1715363,33	5446821,33
SD	10724,718	3030,99
RSD	0,63	0,06

   Contoh perhitungan presisi AUC 110 ppm

   $$\overline{X} = \frac{5449141+5450382+5441689+5446432+5447454+5445830}{6} = 5446821,33$$

   SD=

   $$\sqrt{\frac{(5449141-5446821,33)^2+(5450382-5446821,33)^2+...+(5445830-5446821,33)^2}{6-1}}$$

   = 3030,99

Lampiran 6 (lanjutan)

$$RSD = \frac{3030,99}{5446821,33} \times 100\% = 0,06\ \%$$

Lampiran 7: Perhitungan akurasi INH dan rifampisin

1. INH:

Persamaan kurva baku: Y= 19679x-94946

Keterangan: Y : AUC

x : Kadar

No.	Akurasi	AUC Adisi	AUC Sampel
1.	50 ppm	886639	890510
2.		889356	888853
3.		890346	888684
	$\overline{X}$	888780,33	889349
1	70 ppm	1271136	1272973
2		1270620	1270620
3		1269997	1272159
	$\overline{X}$	1270584,33	1271917,33
1	90 ppm	1606603	1606785
2		1605100	1603408
3		1605150	1600309
	$\overline{X}$	1605617,67	1603500,67

$$\% \text{ Akurasi} = \frac{(2 \text{x} \text{AUC}(\text{sampel} + \text{standar})) - \text{AUCsampel}}{\text{kadar standar dalam kurva baku}} \text{ x } 100\%$$

Lampiran 7 (lanjutan)

Contoh perhitungan akurasi 50 ppm:

Rata-rata AUC (sampel + standar) = 888780,33

Rata-rata AUC sampel = 889349

(2xAUC(sampel + standar))-AUCsampel = 17777560,67 – 889349

= 888211,67

Kadar(2x(sampel + standar))-sampel $= \frac{(Y + 94946)}{19679}$

$= \frac{(888211{,}66 + 94946)}{19679}$

= 49,96 ppm

% Akurasi = $\frac{49{,}96}{50}$ x 100 % = 99,92 %

2. Rifampisin:

Persamaan kurva baku: Y= 29507x + 658220

Keterangan: Y : AUC

x : Kadar

No.	Akurasi	AUC Adisi	AUC Sampel
1.	75 ppm	2753267	2751802
2.		2767945	2751248
3.		2763429	2753413
	$\overline{X}$	2761547	2752154,33
1	105 ppm	3731167	3716723
2		3745155	3734690
3		3725242	3744836
	$\overline{X}$	3733854,67	3732083
1	135 ppm	4419893	4391834
2		4403989	4408874
3		4401257	4400384
	$\overline{X}$	4408379,67	4400364

$$\% \text{ Akurasi} = \frac{(2 \text{x AUC(sampel + standar))- AUCsampel}}{\text{kadar standar dalam kurva baku}} \text{ x } 100\%$$

Contoh perhitungan akurasi 75 ppm:

Rata-rata AUC (sampel + standar) = 2761547

Rata-rata AUC sampel = 2752154,33

AUC(sampel + standar)-AUCsampel = 5523094 – 2752154,33

= 2770939,67

Kadar 2x(sampel + standar)-sampel $= \frac{(Y - 658220)}{29507}$

$= \frac{(2770939,67 - 658220)}{29507}$

= 71,60 ppm

% Akurasi = $\frac{71,60}{75}$ x 100 % = 95,47 %

Lampiran 8: Penetapan kadar INH dan rifampisin dalam sampel

Diketahui :

Bobot tablet : 0,99 gram

Bobot sampel yang ditimbang : 0,03 gram

1. INH:

No.	Pengenceran	AUC Sampel	Kadar Sampel (ppm)	Dalam Labu 10 ml (µg)	Dalam Labu 100 ml (µg)	Dalam 1 Tablet (mg)
1.	2x	890510	50,08	500,77	10015,31	300,46
2.		888853	49,99	499,92	9998,47	299,95
3.		888684	49,98	499,84	9996,75	299,90
	$\overline{X}$	889349	50,02	500,18	10003,51	300,11
1	1,43x	1272973	69,32	693,25	9903,56	297,11
2		1270620	69,39	693,92	9913,15	297,40
3		1272159	69,25	692,51	9892,93	296,79
	$\overline{X}$	1271917,33	69,32	693,23	9903,21	297,10
1	1,11x	1606785	86,48	864,75	9608,27	288,25
2		1603408	86,30	863,03	9589,21	287,68
3		1600309	86,15	861,45	9571,71	287,15
	$\overline{X}$	1603500,67	86,31	863,08	9589,73	287,69

Lampiran 8 (lanjutan)

Contoh perhitungan penetapan kadar INH:

Persamaan kurva baku: Y= 19679x-94946

Keterangan: Y : Rata-rata AUC sampel

x : Rata-rata kadar sampel (ppm)

Sampel 2x pengenceran

Y = 19679x-94946

889349 = 19679x-94946

x = 50,018 ppm

kadar dalam labu ukur 10 ml = 50,018 µg/ml x 10ml

= 500,18 µg

Kadar dalam labu ukur 100 ml = $\frac{100ml}{5\ ml}$ x 500,18 µg

= 10003,6 µg = 10,004 mg

Kadar dalam 1 tablet = $\frac{300mg}{10mg}$ x 10,004 mg

= 300,12 mg

% Penetapan kadar = $\frac{300{,}12}{300}$ x 100%= 100,04 %

Lampiran 8 (lanjutan)

2. Rifampisin

No.	Pengenceran	AUC Sampel	Kadar Sampel (ppm)	Dalam Labu 10 ml (µg)	Dalam Labu 100 ml (µg)	Dalam 1 Tablet (mg)
1.	2x	2751802	70,95	709,52	14190,41	425,71
2.		2751248	70,93	709,33	14186,65	425,60
3.		2753413	71,01	710,07	14201,33	426,04
	$\overline{X}$	2752154,33	70,96	709,64	14192,80	425,78
1	1,43x	3716723	103,65	1036,54	14807,64	444,23
2		3734690	104,26	1042,62	14894,63	446,84
3		3744836	104,61	1046,06	14943,75	448,31
	$\overline{X}$	3732083	104,17	1041,74	14882,00	446,46
1	1,11x	4391834	126,53	1265,33	14059,24	421,78
2		4408874	127,11	1271,11	14123,41	423,70
3		4400384	126,82	1268,23	14091,44	422,74
	$\overline{X}$	4400364	126,82	1268,22	14091,36	422,74

Contoh perhitungan penetapan kadar rifampisin:

Persamaan kurva baku: Y= 29507x + 658220

Keterangan: Y : Rata-rata AUC sampel

x : Rata-rata kadar sampel (ppm)

Lampiran 8 (lanjutan)

Sampel 2x pengenceran

Y = 29507x + 658220

2752154,333 = 29507x + 658220

x = 70,96 ppm

kadar dalam labu ukur 10 ml = 70,964 µg/ml x 10 ml

= 709,64 µg

Kadar dalam labu ukur 100 ml = $\frac{100ml}{5\ ml}$ x 709,64 µg

= 14192,8 µg = 14,19 mg

Kadar dalam 1 tablet = $\frac{450\ ml}{15\ ml}$ x 14,19 mg

= 425,79 mg

% Penetapan kadar = $\frac{425,79}{450}$ x 100%= 94,62 %

Lampiran 9: Surat persetujuan pemberian bahan baku produksi dari PT. Sanbe Farma

SANBE

PT. SANBE FARMA Pharmaceutical Manufacturer
Jl. Taman Sari 10 Bandung 40116 Tromol Pos 850 Bandung 40008
Telp : 62 - 22 - 4207725 (Hunting)
Fax : 62 - 22 - 4238476
Bandung 40116 - Indonesia

Bandung, 04 Maret 2010

No. : 14/III/Reg/Sk/2010
Lamp. : 1 (satu) berkas
Hal : ***Bahan Baku Ifampicin 10 gram & Isoniazid 10 gram***

Kepada
Yth. **Bp. Akhmad Fauzy, S.Si. M. Si., Ph.D**
Dekan
Universitas Islam Indonesia
Fak. MIPA
Jl. Kaliurang Km. 14,5
Jogjakarta
Telp. : 0274 895920, 896439, 895402, 895707

Dengan hormat,

Sehubungan dengan surat Bapak No. 115/Dek/20/Bag. TA/II/2010 tanggal 17 Februari 2010 perihal permintaan bahan baku obat, bersama ini kami sampaikan bahan baku obat yang dilengkapi dengan fotokopi Sertifikat Analisa, sebagai berikut :

1. Rifampicin sebanyak 10 gram
2. Isoniazid sebanyak 10 gram

yang diperlukan oleh mahasiswi bernama : Vita Widayamurni No. Mhs. 06613132 untuk keperluan penelitian tugas akhir dan bahan baku kami berikan secara gratis.

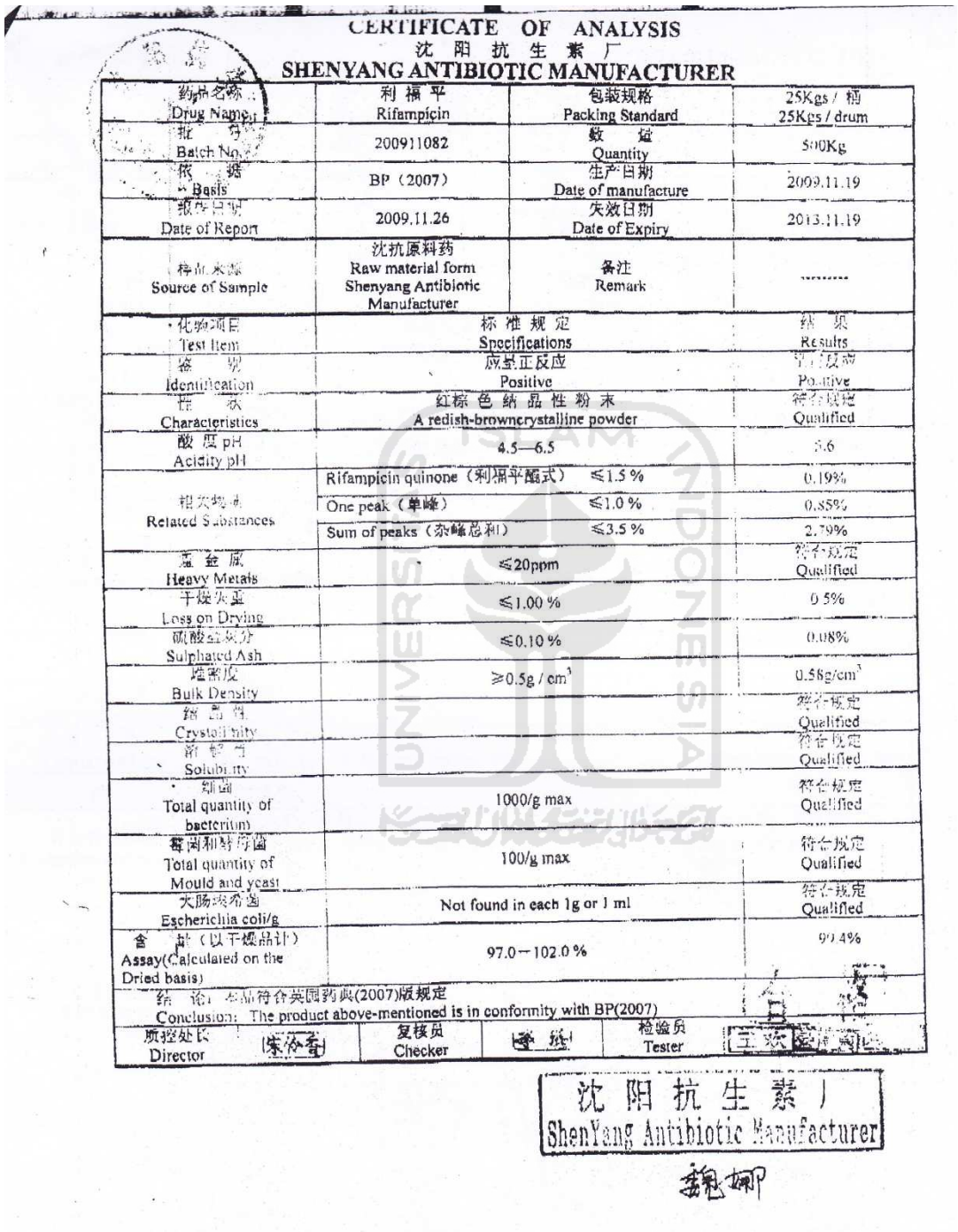
Atas perhatian Bapak, kami ucapkan terima kasih.

Hormat kami,

Dra. Widyati
Registration Manager

W/t/My-doc/Bahan Baku/Univ Islam/Vita

Lampiran 10: *Certificate of Analysis* (CoA) rifampicin



CERTIFICATE OF ANALYSIS
沈阳抗生素厂
SHENYANG ANTIBIOTIC MANUFACTURER

药品名称 Drug Name	利福平 Rifampicin	包装规格 Packing Standard	25Kgs / 桶 25Kgs / drum
批号 Batch No.	200911082	数量 Quantity	500Kg
依据 Basis	BP (2007)	生产日期 Date of manufacture	2009.11.19
报告日期 Date of Report	2009.11.26	失效日期 Date of Expiry	2013.11.19
样品来源 Source of Sample	沈抗原料药 Raw material form Shenyang Antibiotic Manufacturer	备注 Remark	.....
化验项目 Test Item	标准规定 Specifications		结果 Results
鉴别 Identification	应呈正反应 Positive		呈正反应 Positive
性状 Characteristics	红棕色结晶性粉末 A redish-brownerystalline powder		符合规定 Qualified
酸度 pH Acidity pH	4.5—6.5		5.6
相关物质 Related Substances	Rifampicin quinone (利福平醌式) ≤1.5 %		0.19%
	One peak (单峰) ≤1.0 %		0.85%
	Sum of peaks (杂峰总和) ≤3.5 %		2.79%
重金属 Heavy Metals	≤20ppm		符合规定 Qualified
干燥失重 Loss on Drying	≤1.00 %		0.5%
硫酸盐灰分 Sulphated Ash	≤0.10 %		0.08%
堆密度 Bulk Density	≥0.5g / cm³		0.58g/cm³
结晶性 Crystallinity			符合规定 Qualified
溶解性 Solubility			符合规定 Qualified
细菌 Total quantity of bacterium	1000/g max		符合规定 Qualified
霉菌和酵母菌 Total quantity of Mould and yeast	100/g max		符合规定 Qualified
大肠埃希菌 Escherichia coli/g	Not found in each 1g or 1 ml		符合规定 Qualified
含量 (以干燥品计) Assay(Calculated on the Dried basis)	97.0—102.0 %		99.4%

结论：本品符合英国药典(2007)版规定
Conclusion: The product above-mentioned is in conformity with BP(2007)

质控处长 Director | 复核员 Checker | 检验员 Tester

沈阳抗生素厂
ShenYang Antibiotic Manufacturer

Lampiran 11: *Certificate of Analysis* (CoA) INH

浙江新赛科药业有限公司 SECOND PHARMA CO.,LTD

检 验 报 告 单

CERTIFICATE OF ANALYSIS

品 名 Name of product	异烟肼 Isoniazid	报告单号 Report NO.	091106-08
批 号 Lot NO.	P091116 ✓	生产日期 Manufacture Date	2009 年 10 月 28 日 October 28, 2009
包装规格 Packages	25Kg/桶 25Kg/Drum	报告日期 Report Date	2009 年 11 月 06 日 November 6, 2009
数 量 Net weight	500 Kg	有效期至 Retest Date	2012 年 10 月 27 日 October27, 2012 ✓
检验项目 ANALYTICAL ITEMS	标准规定值 SPECIFICATION		检验结果 ANALYTICAL RESULTS
【性状】 Characteristic			
外观 Appearance	应为白色或类白色结晶性粉末或无色结晶 White or whitish crystalline powder or colourless crystals		白色结晶性粉末 White crystalline powder
【鉴别】 Identification			-
A: 熔点 Melting range	170℃ ~ 174℃		171℃ ~ 172℃
B: 红外吸收 Infrared Absorption	样品的红外吸收图谱应与异烟肼对照品的图谱一致 Identical with the spectrum obtained with isoniazid CRS		与对照品的图谱一致 dentical with the spectrum obtained with isoniazid CRS.
【检查】 Tests			
溶液澄清度 Clarity of the solution	应澄清 Clear		澄清 Clear
溶液颜色 Color of the solution	不深于 BY_7 Not more than of Reference solution BY_7		浅于 BY_7 Less than Reference solution BY_7
pH	6.0 ~ 8.0		6.9
肼和有关物质 Hydrazine and related substances	单一杂质: 不超过 0.2% Any impurity: Not more than 0.2% 肼: 不超过 0.05% Hydrazine: Not more than 0.05%		单一杂质: 未检出 Any impurity: ND 肼: 未检出 Hydrazine: ND
重金属 Heavy metals	不得过 0.001% Not more than 0.001%		低于 0.001% Less than 0.001%
干燥失重 Loss on drying	不得过 0.5% Not more than 0.5%		0.1%
硫酸盐灰份 Sulfate ash	不得过 0.1% Not more than 0.1%		0.1%
【含量测定】 Assay	以干品计，含异烟肼（$C_6H_7N_3O$）应为 99.0% ~ 101.0% Basis on dried, it contains not less than 99.0% and not more than 101.0% of Isoniazid ($C_6H_7N_3O$)		99.6%
检验依据 According to		欧洲药典/英国药典 EP/BP	
结 论 Conclusion		合格 Complies	

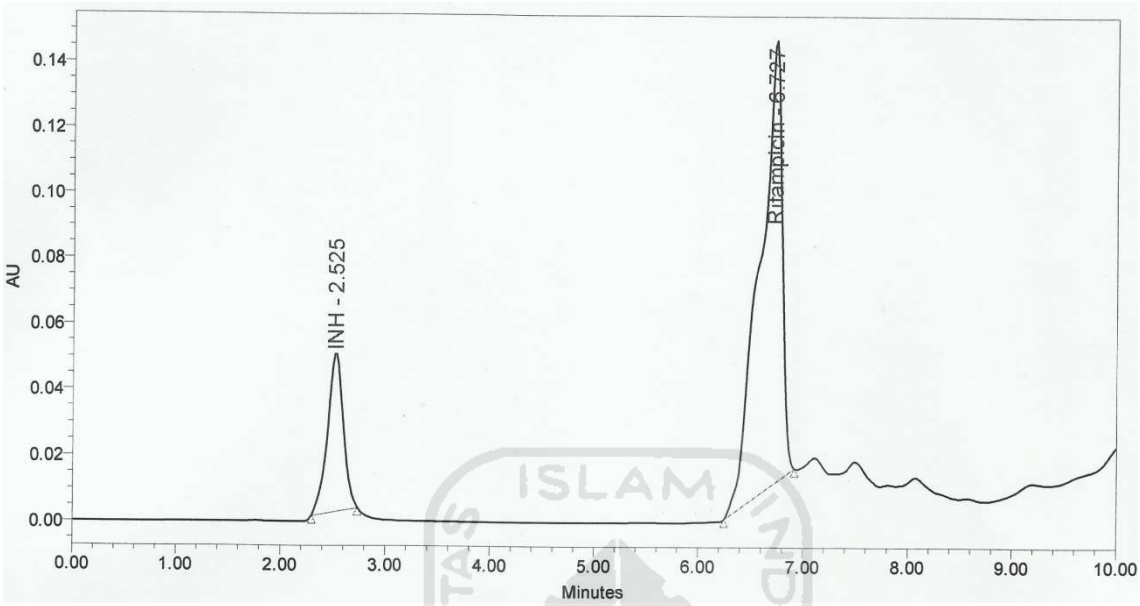
检验者: Analyst 复核者: Checker QC 经理: QC Manager

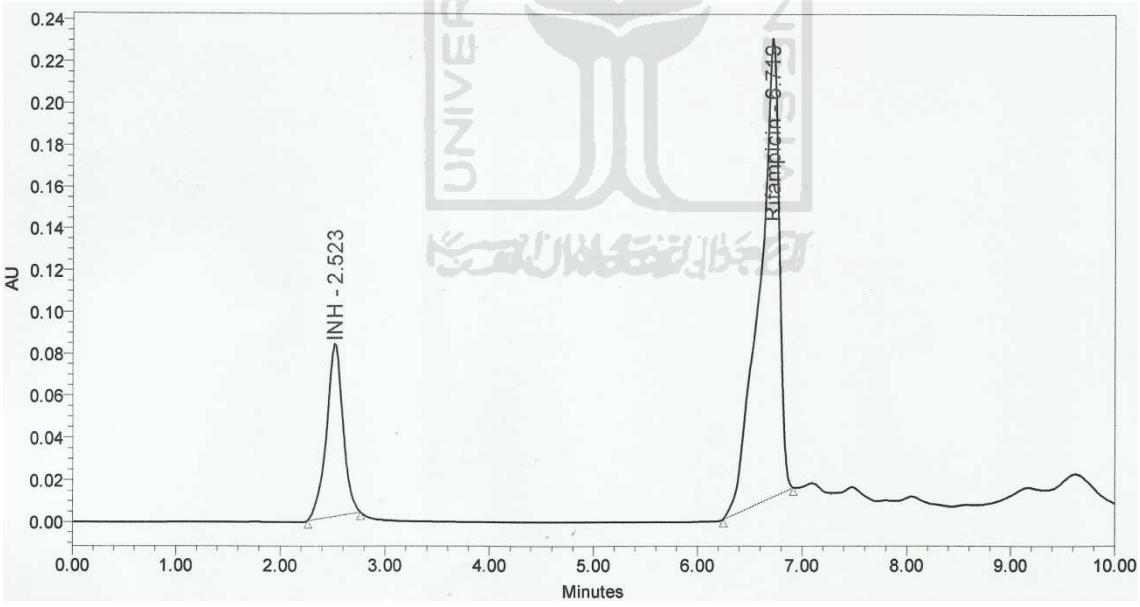
浙江新赛科药业有限公司 检验专用章

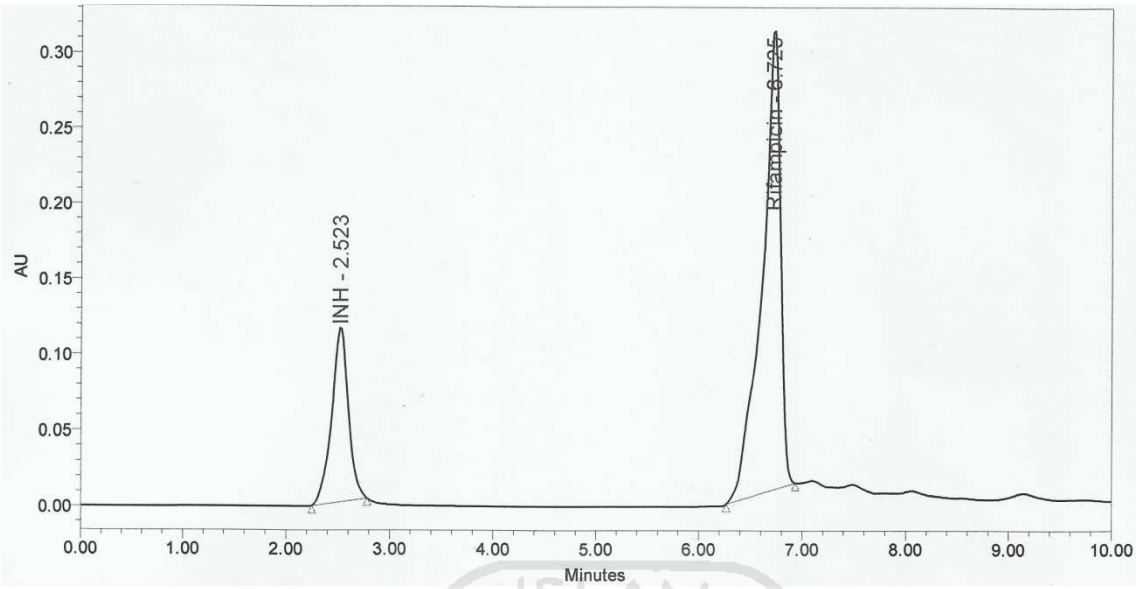
SECOND PHARMA 浙江新赛科药业有限公司 检验专用章

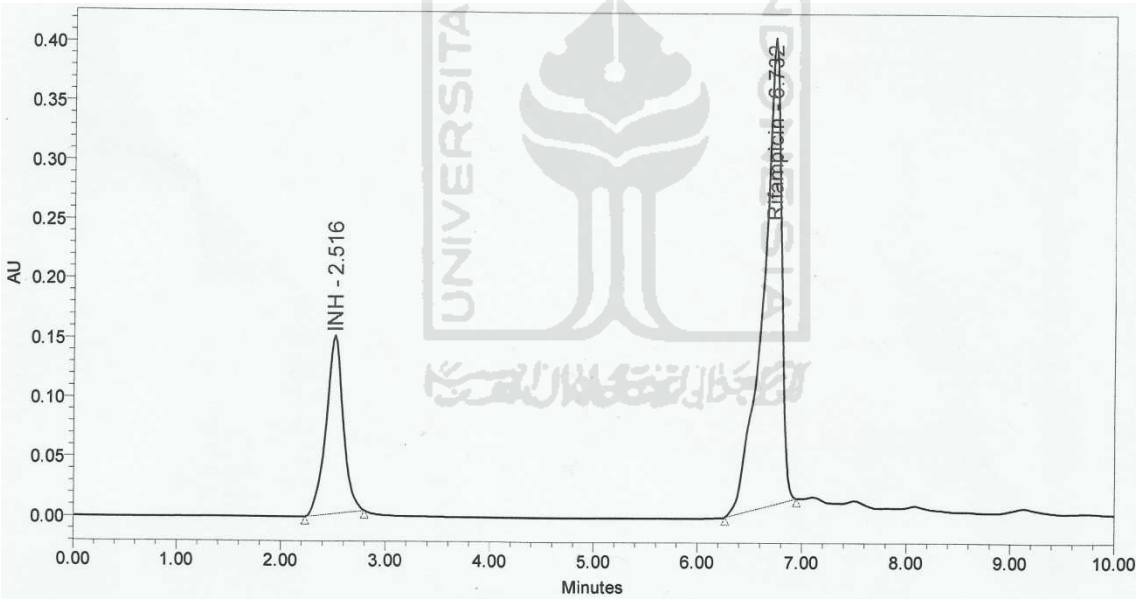
TDP

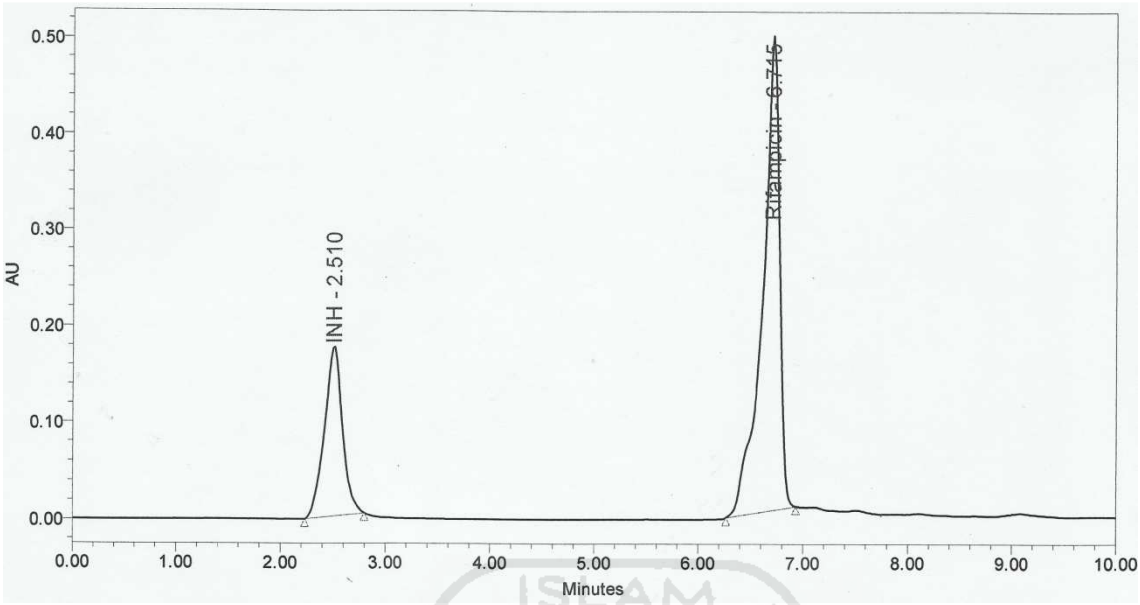
Lampiran 12: Kromatogram kurva baku INH dan rifampisin dengan seri kadar 30/45, 50/75, 70/105, 90/135, dan 110/165ppm





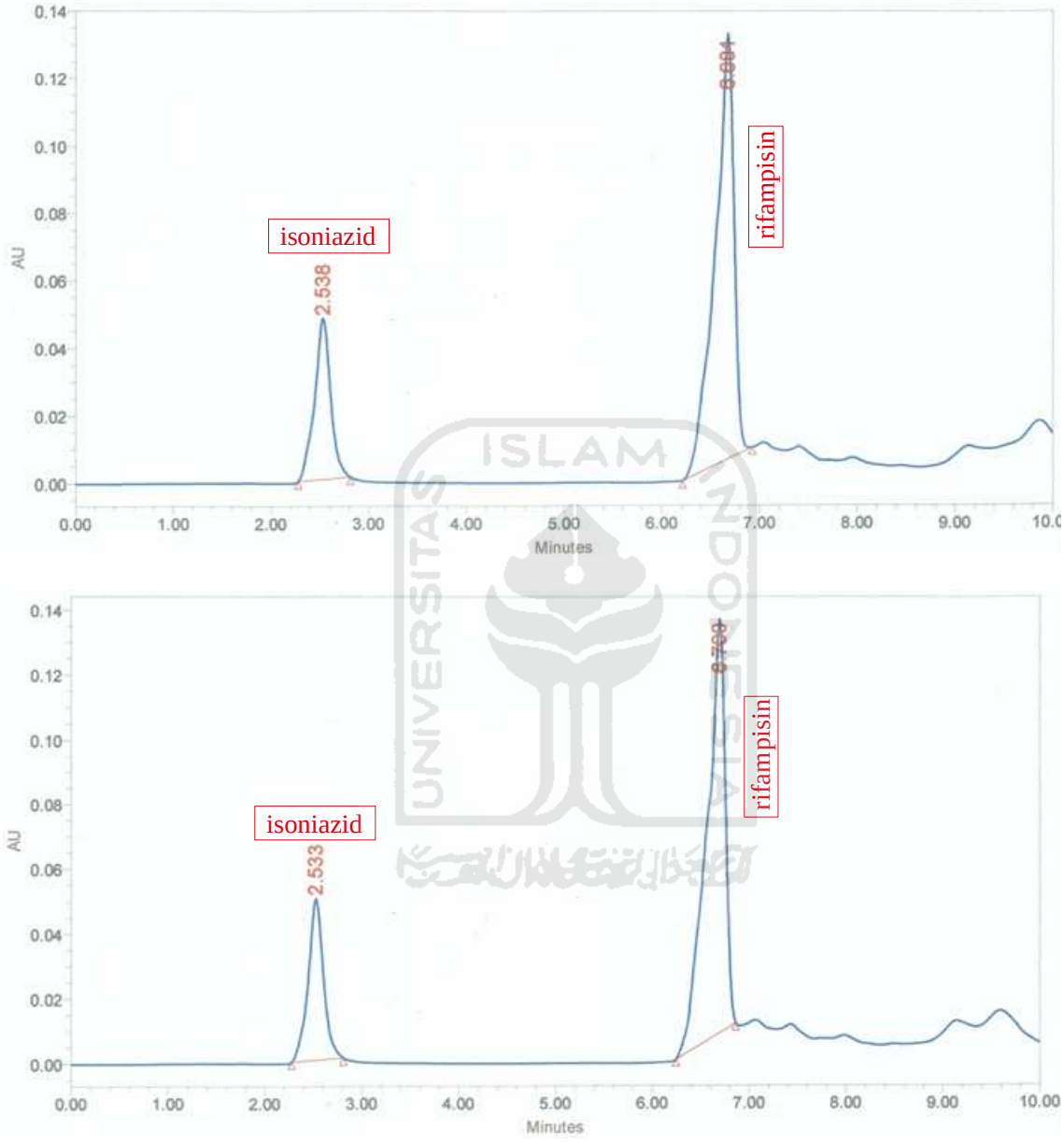

INH - 2.523
Rifampicin - 6.725
AU
Minutes

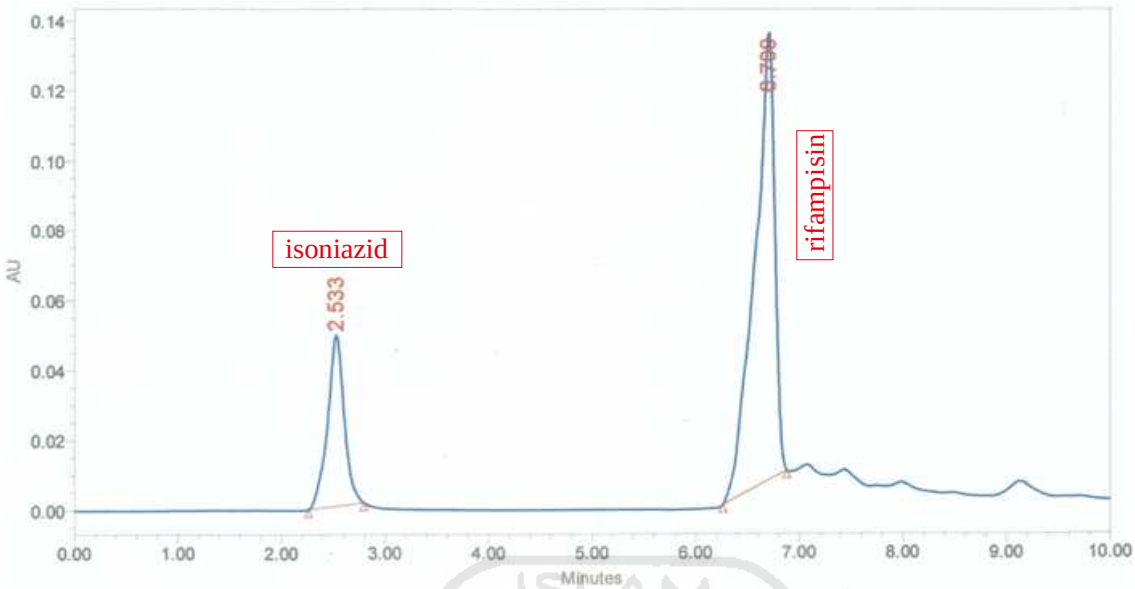

INH - 2.516
Rifampicin - 6.732
AU
Minutes

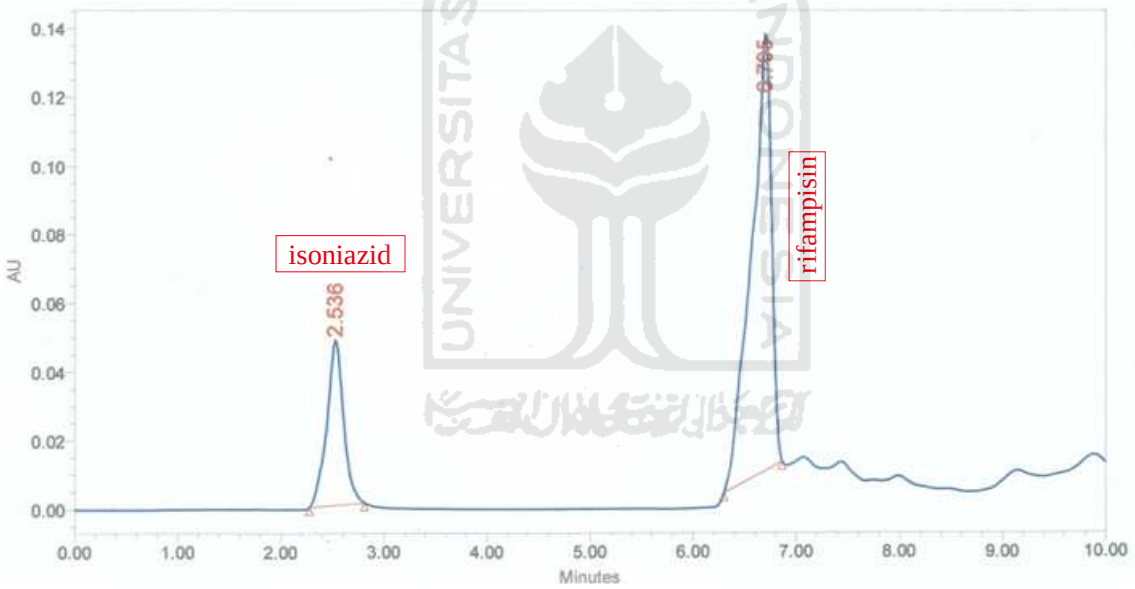

0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
AU
INH - 2.510
Rifampicin - 6.745
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
Minutes

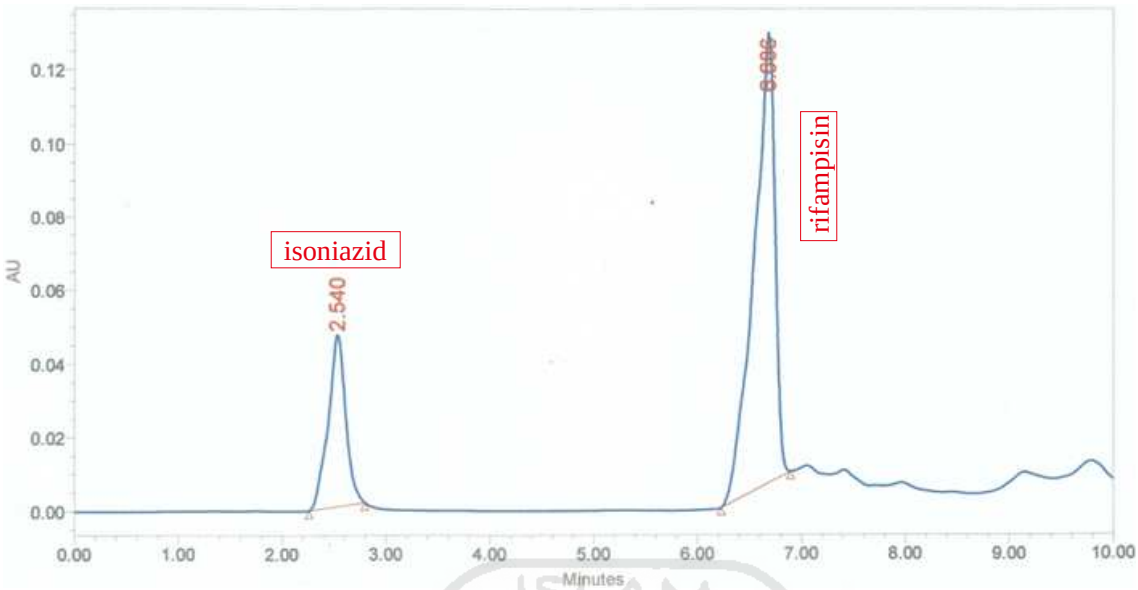
Lampiran 13: Kromatogram presisi INH dan rifampisin

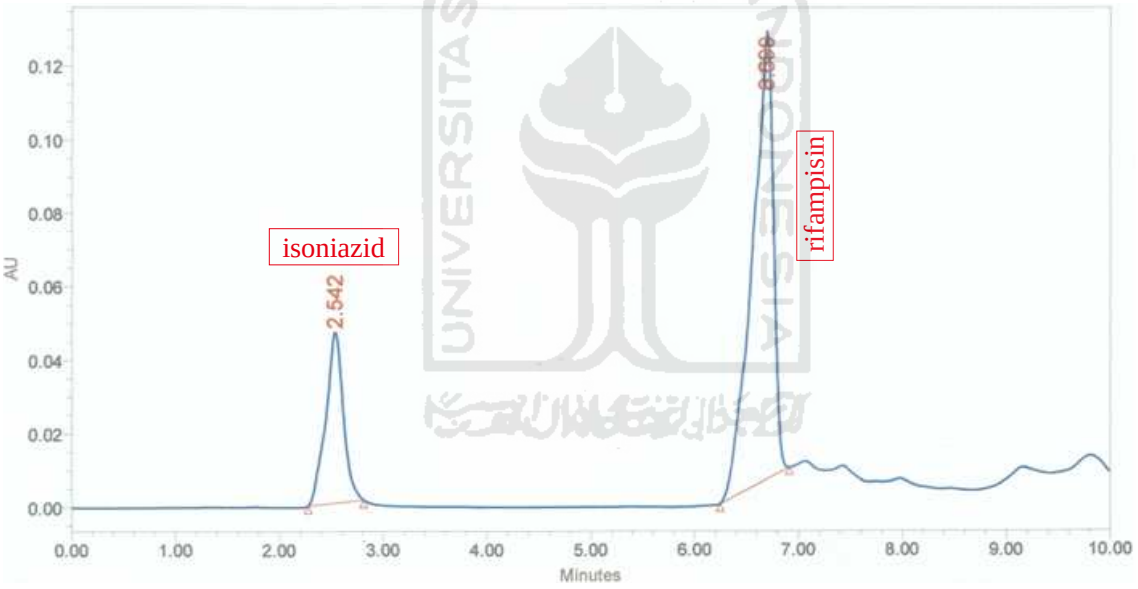
1. Kadar 30/45 ppm



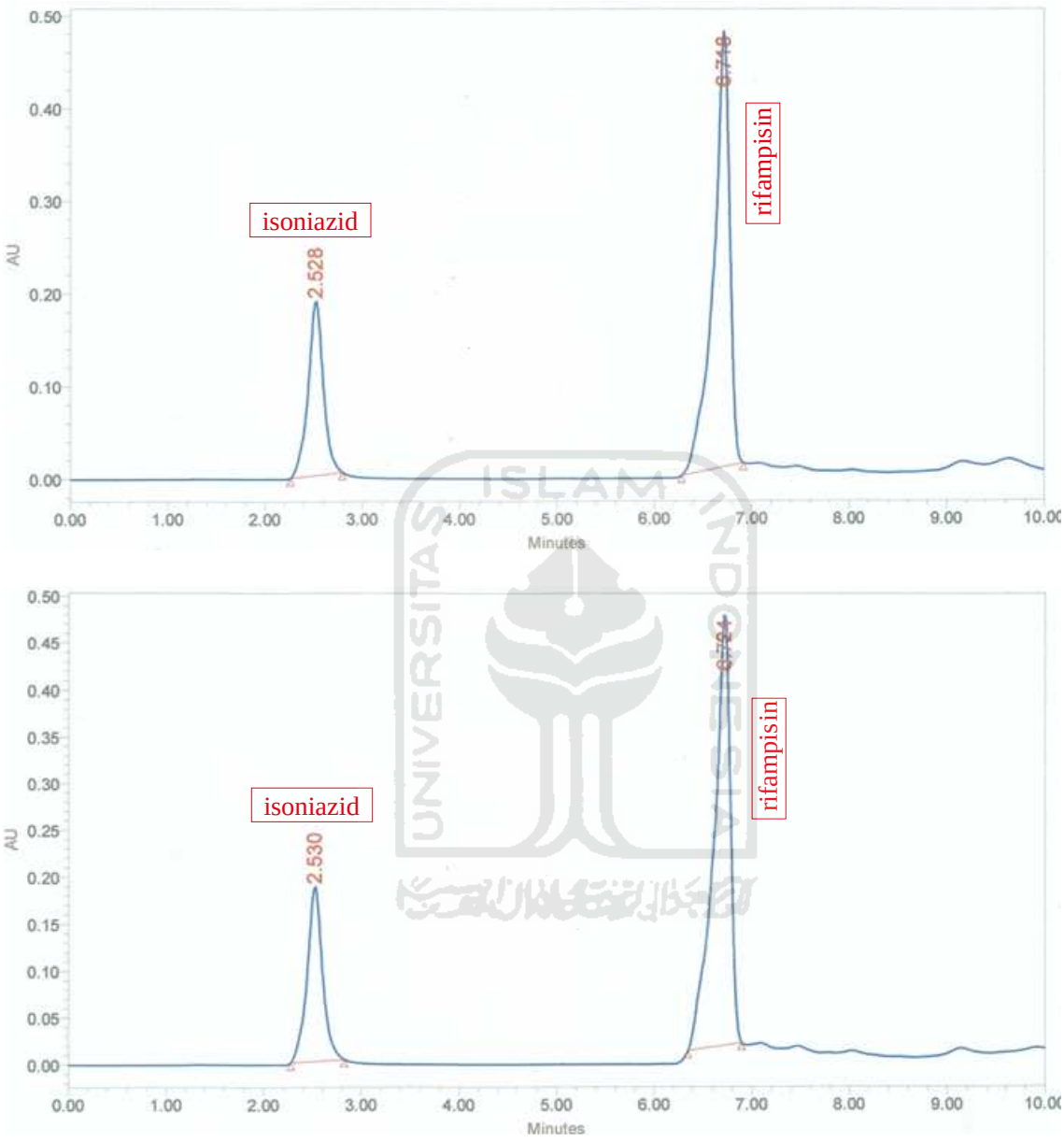

isoniazid
2.533
rifampisin
6.799
AU
Minutes

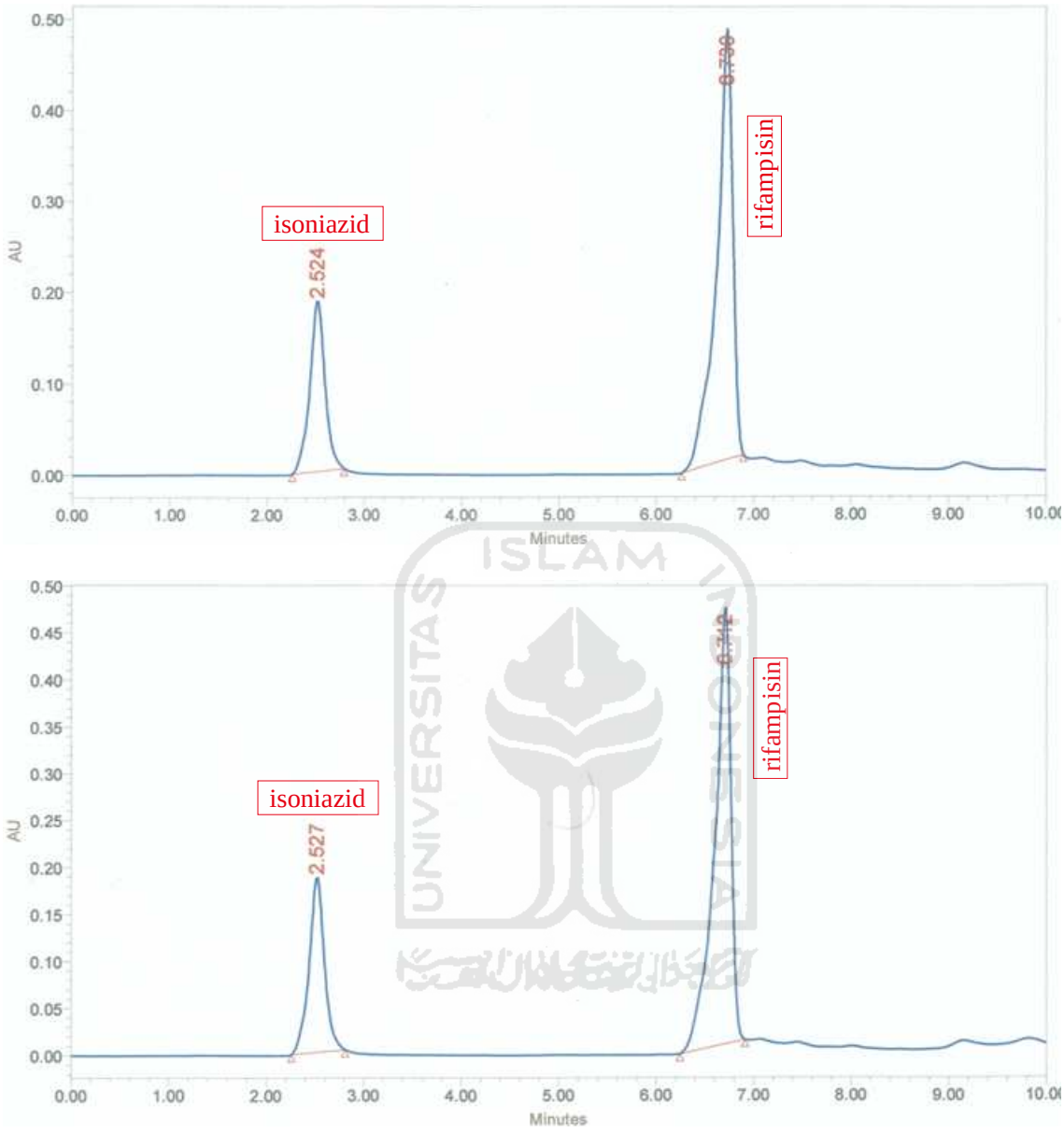

isoniazid
2.536
rifampisin
6.765
AU
Minutes

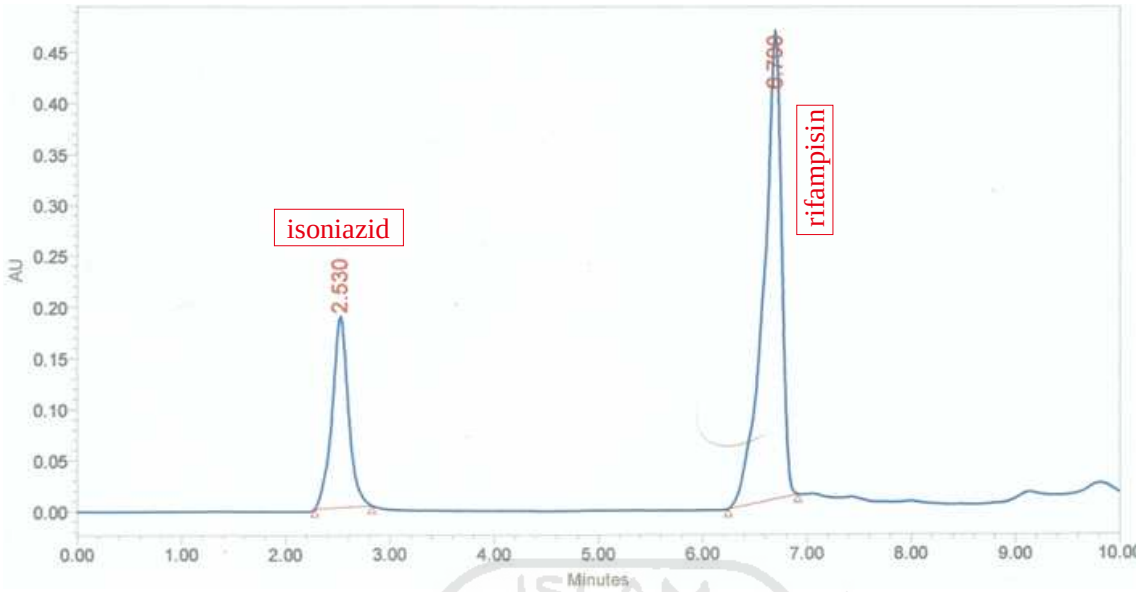

isoniazid
2.540
rifampisin
6.996
AU
Minutes
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00

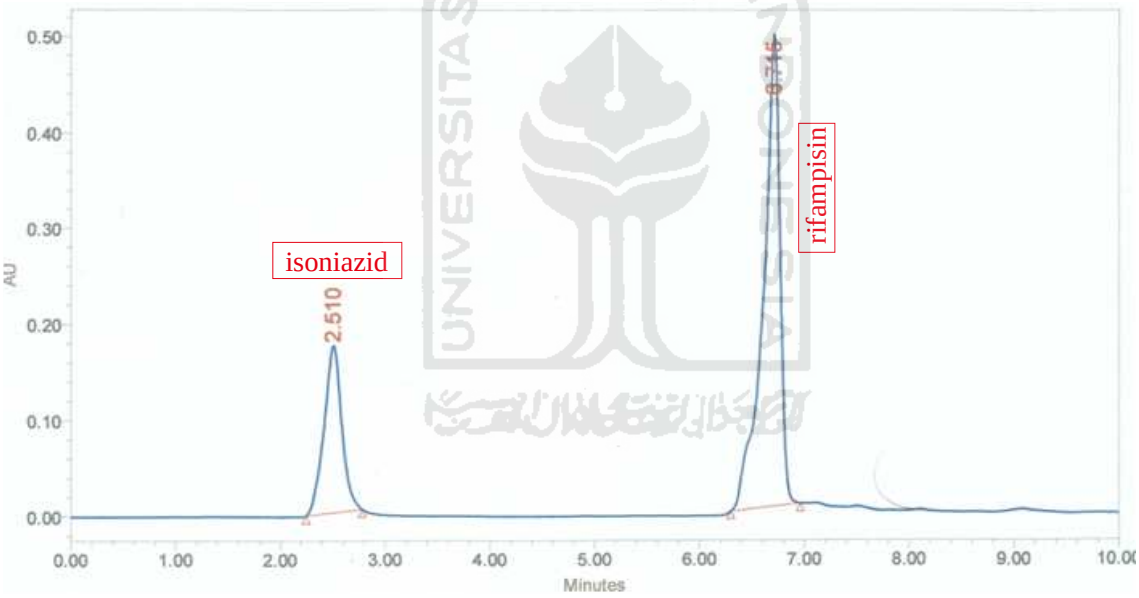

isoniazid
2.542
rifampisin
6.999
AU
Minutes
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00

2. Kadar 110/165 ppm



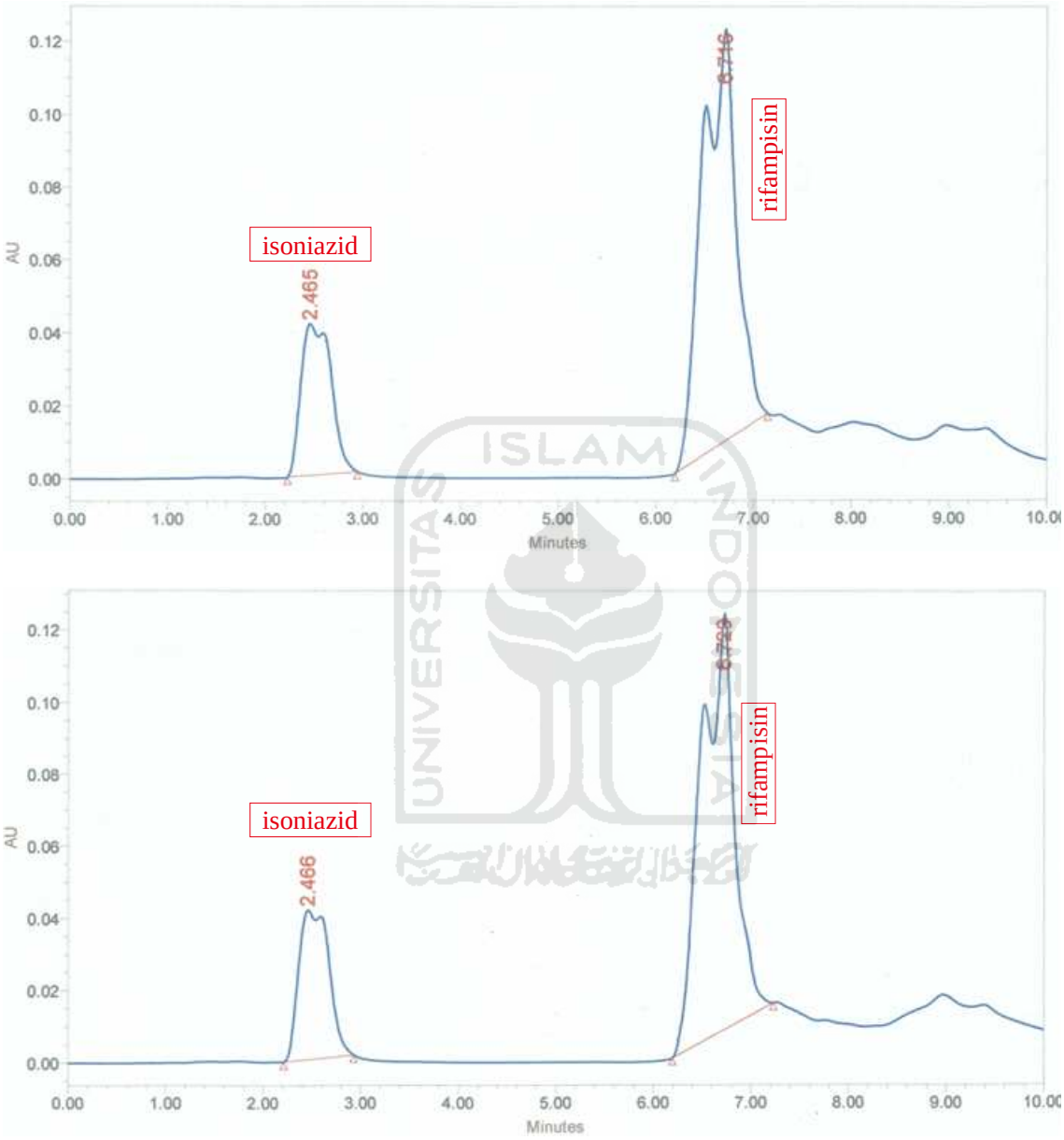

isoniazid
2.524
rifampisin
6.730
AU
Minutes
isoniazid
2.527
rifampisin
6.712
AU
Minutes

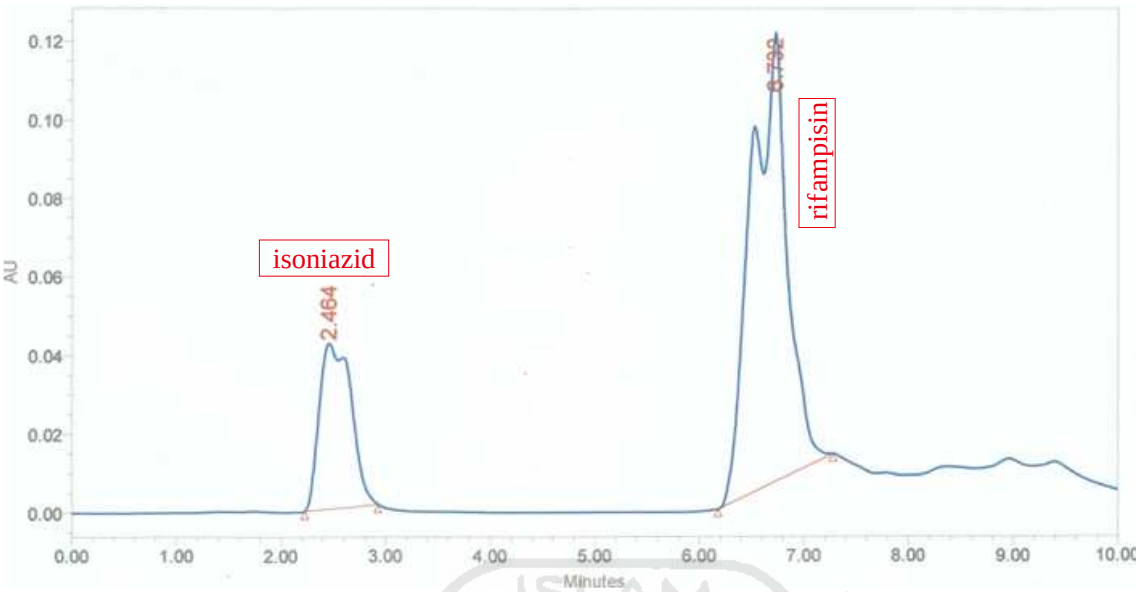

isoniazid
2.530
rifampisin
6.700
AU
Minutes


isoniazid
2.510
rifampisin
6.746
AU
Minutes

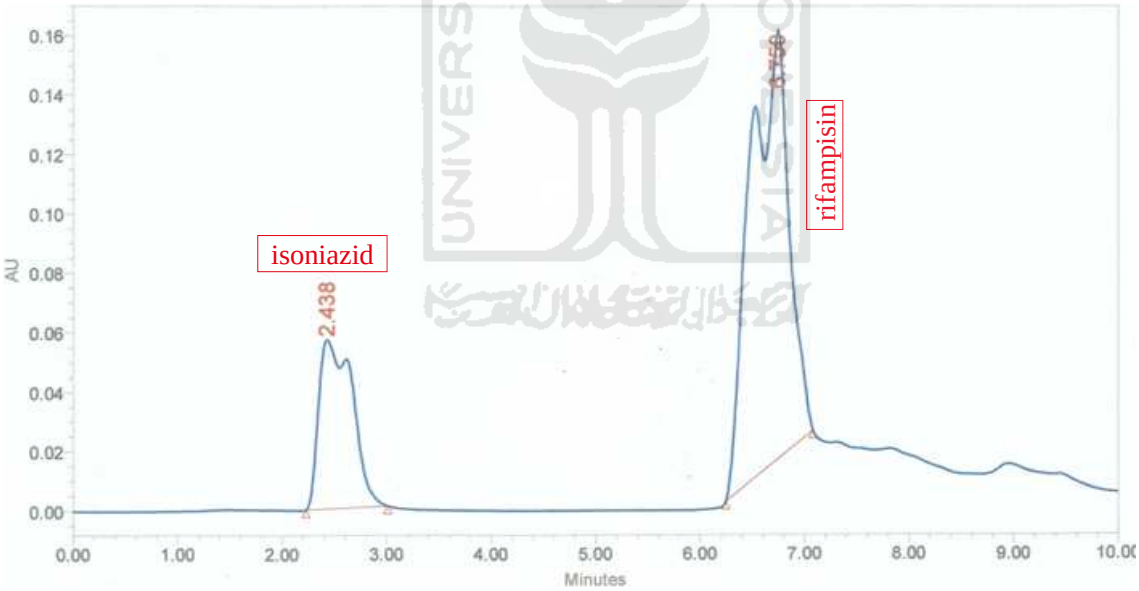
Lampiran 14: Kromatogram akurasi INH dan rifampisin

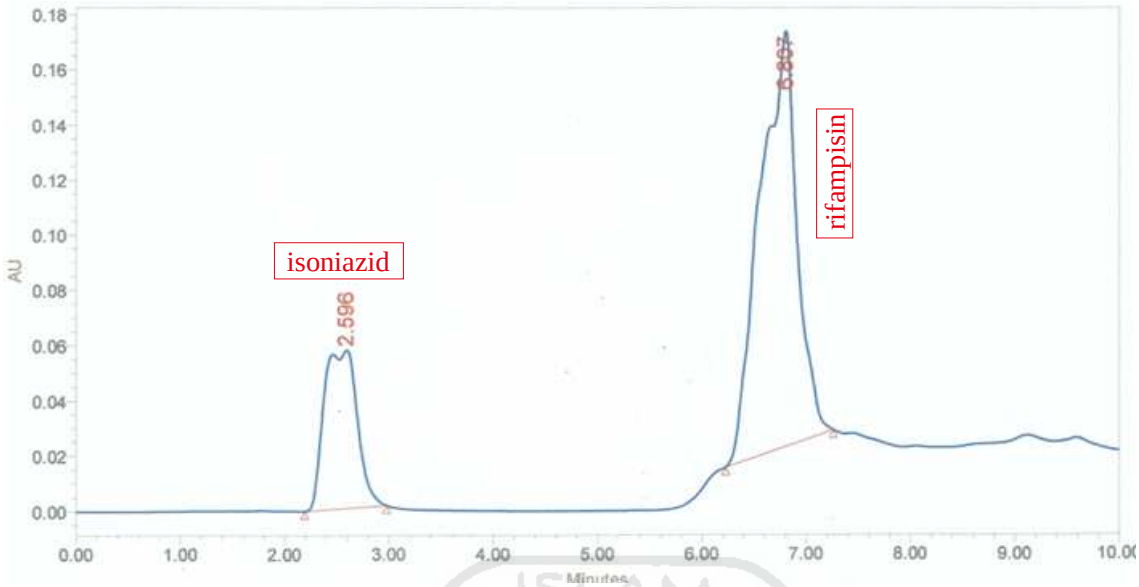
1. Kadar 50/75 ppm

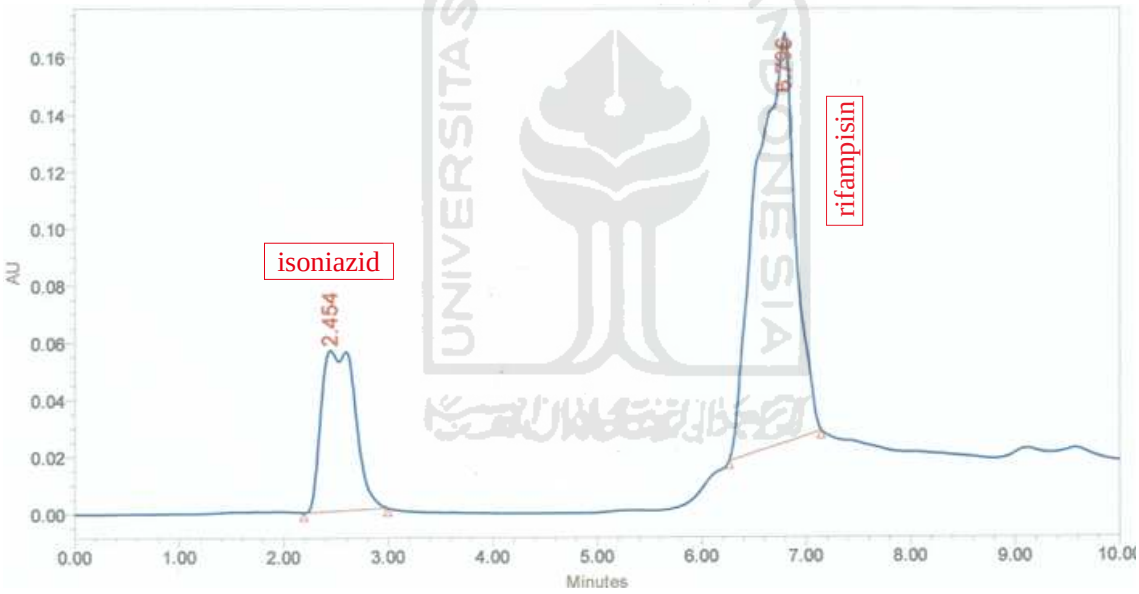




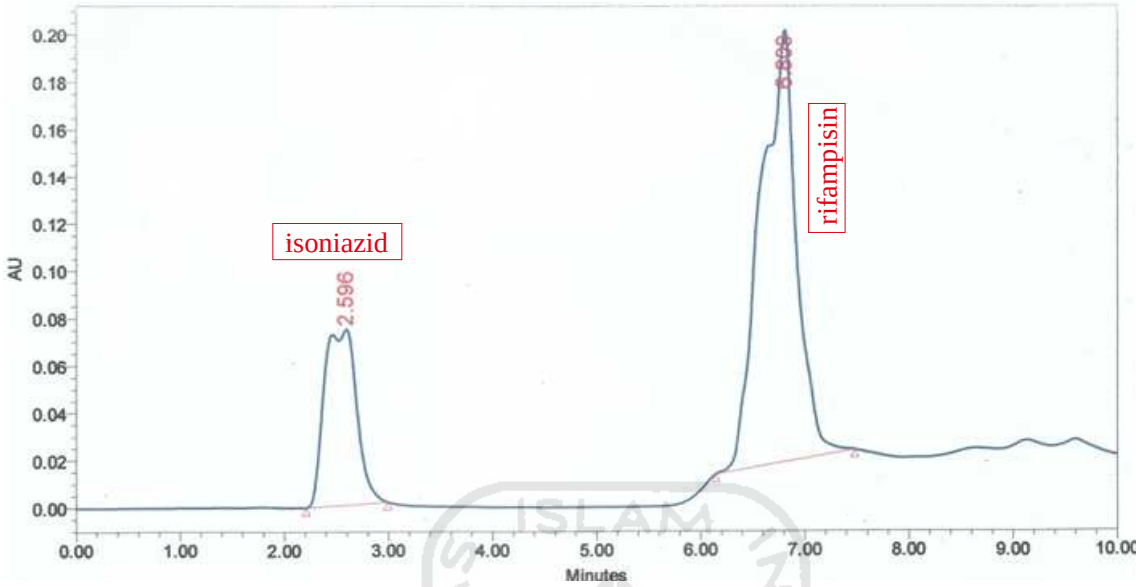
2. Kadar 70/105 ppm

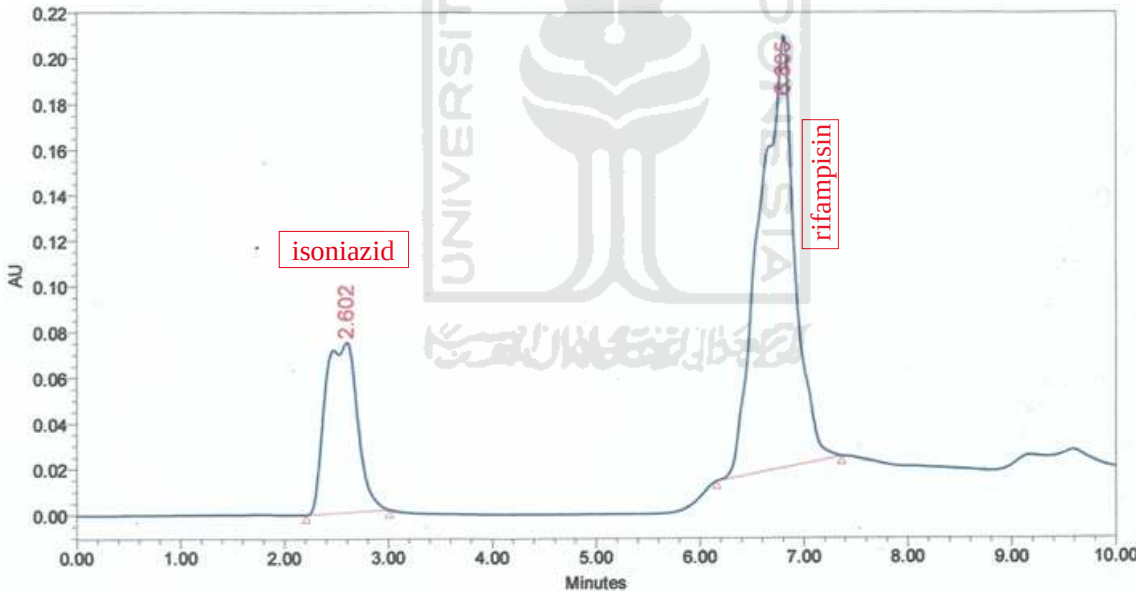


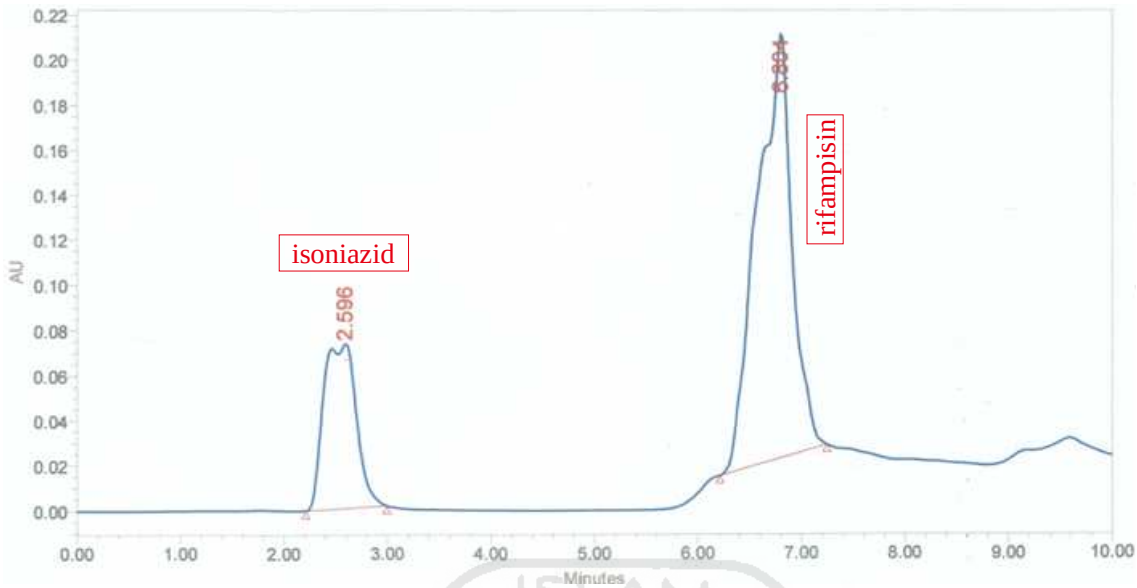

isoniazid
2.596
rifampisin
6.807
AU
Minutes


isoniazid
2.454
rifampisin
6.796
AU
Minutes

3. Kadar 90/135 ppm

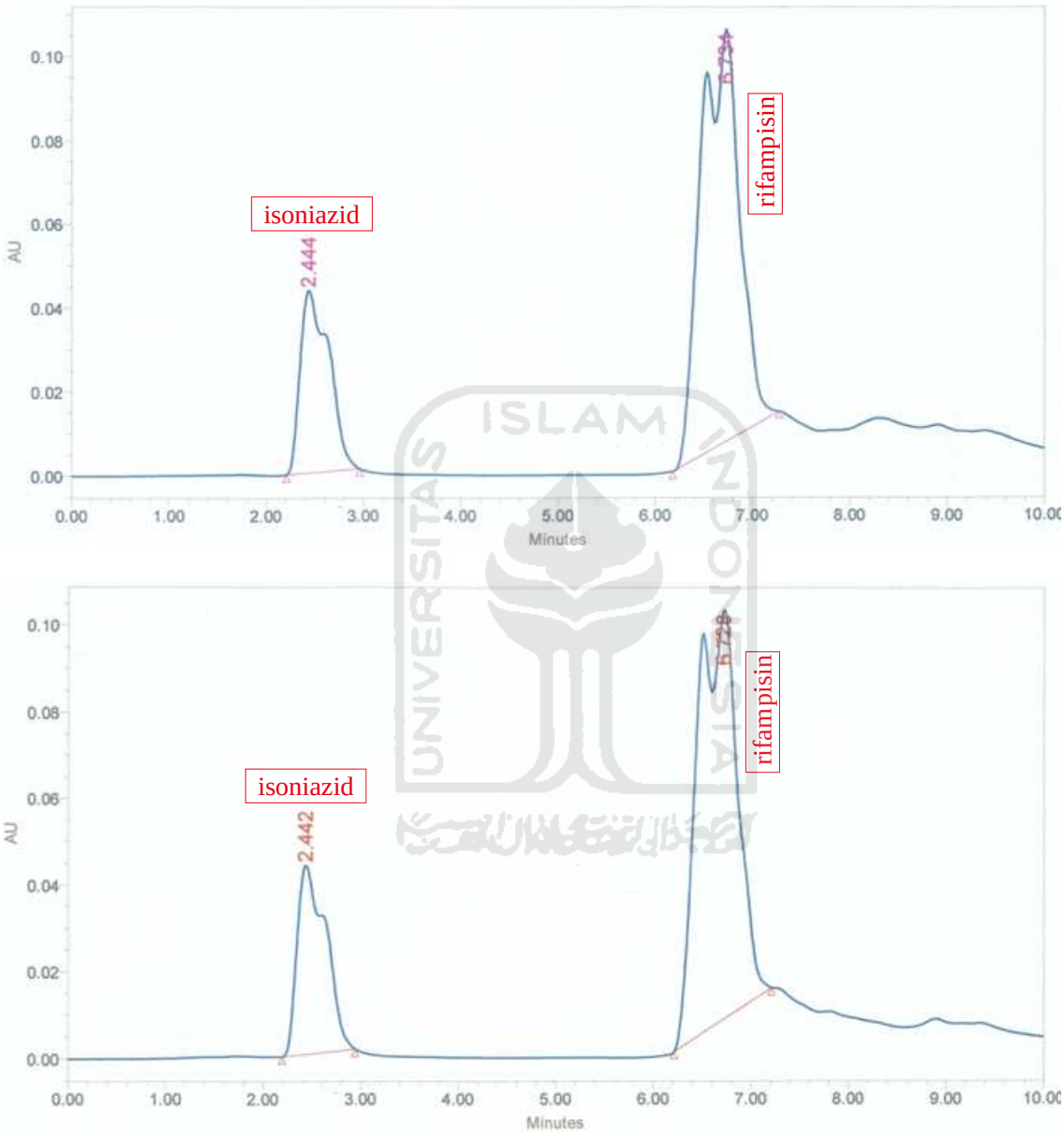


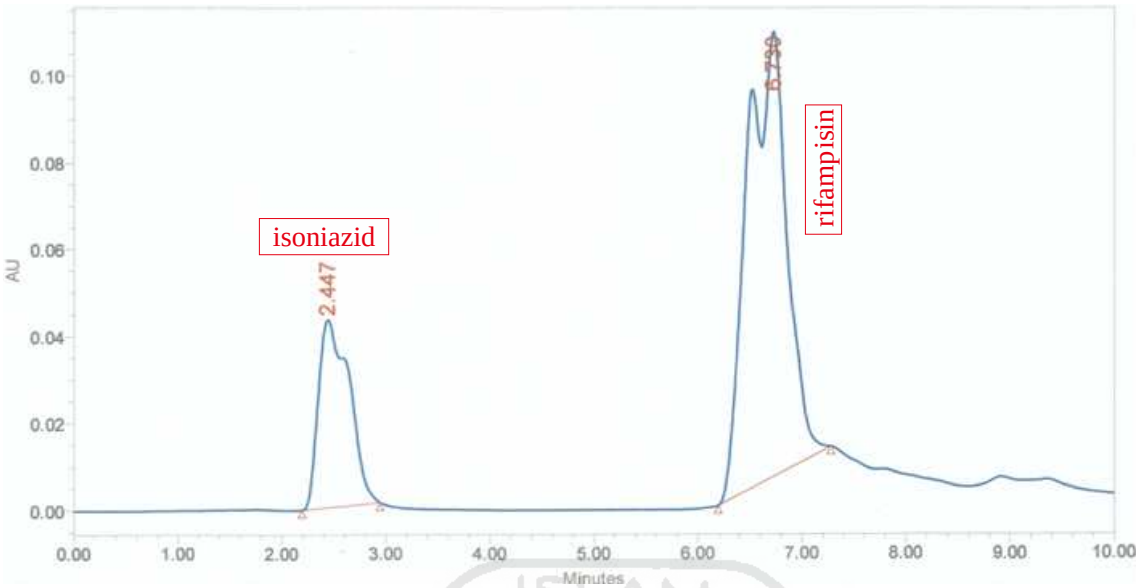



isoniazid
2.596
rifampisin
6.804
AU
Minutes
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00

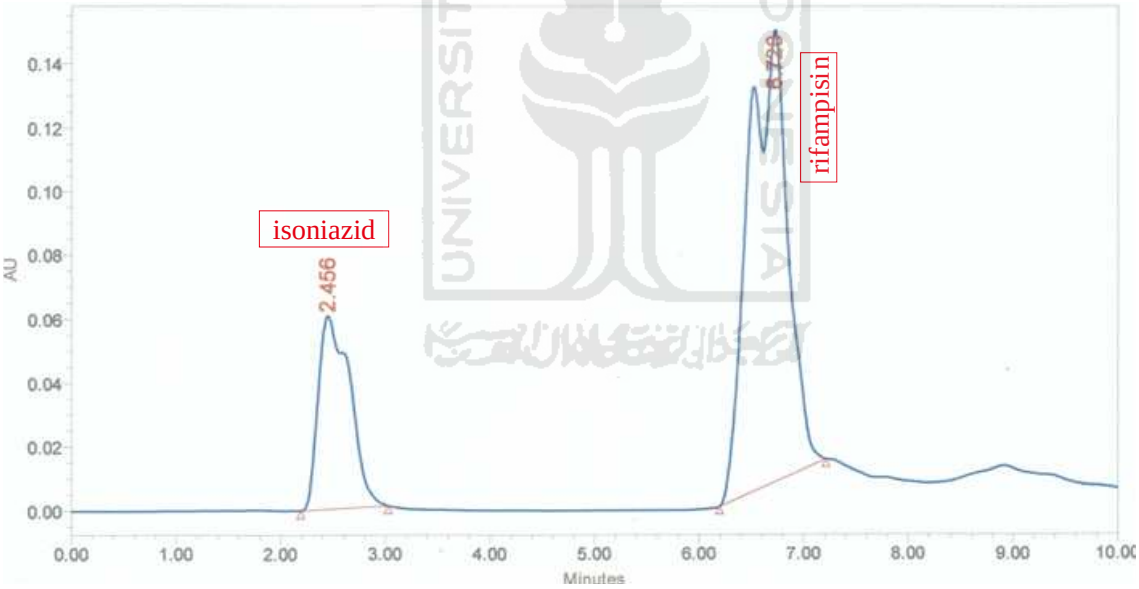
Lampiran 15: Kromatogram pengukuran INH dan rifampisin dalam sampel

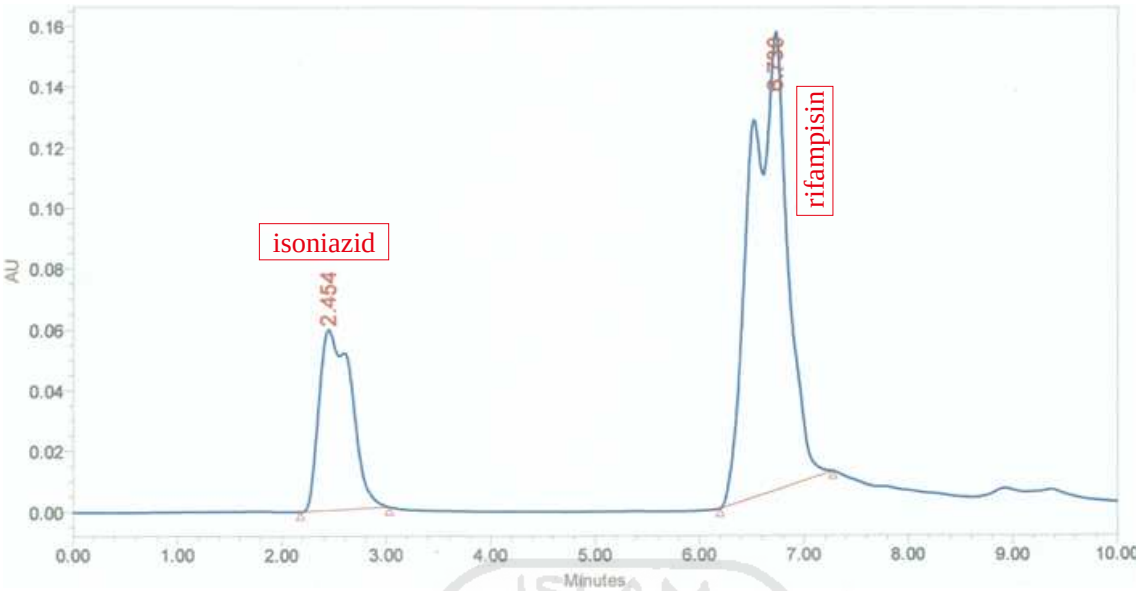
1. Kadar 50/75 ppm

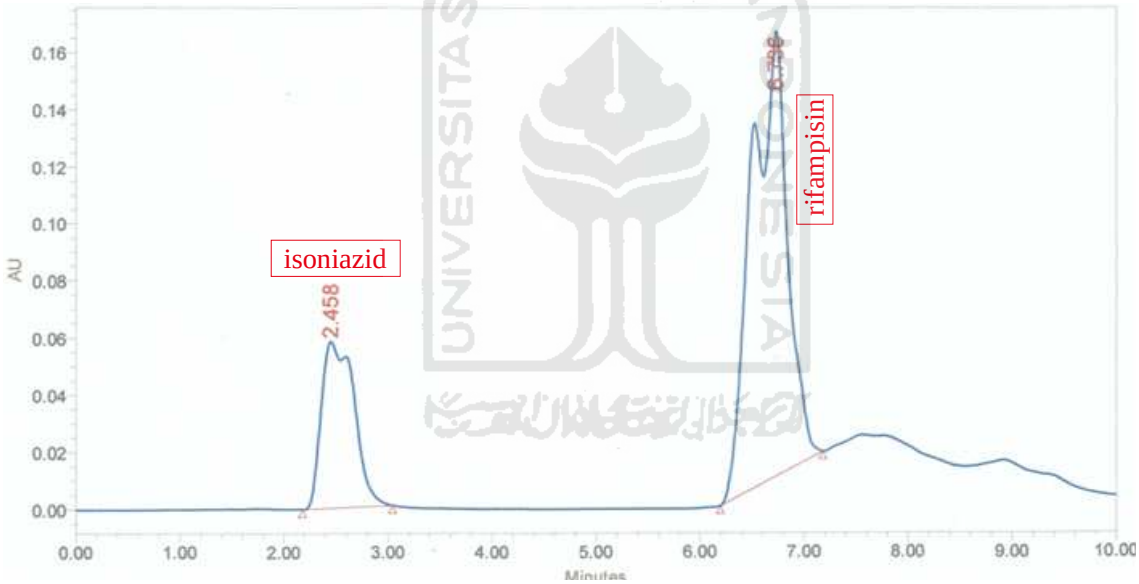




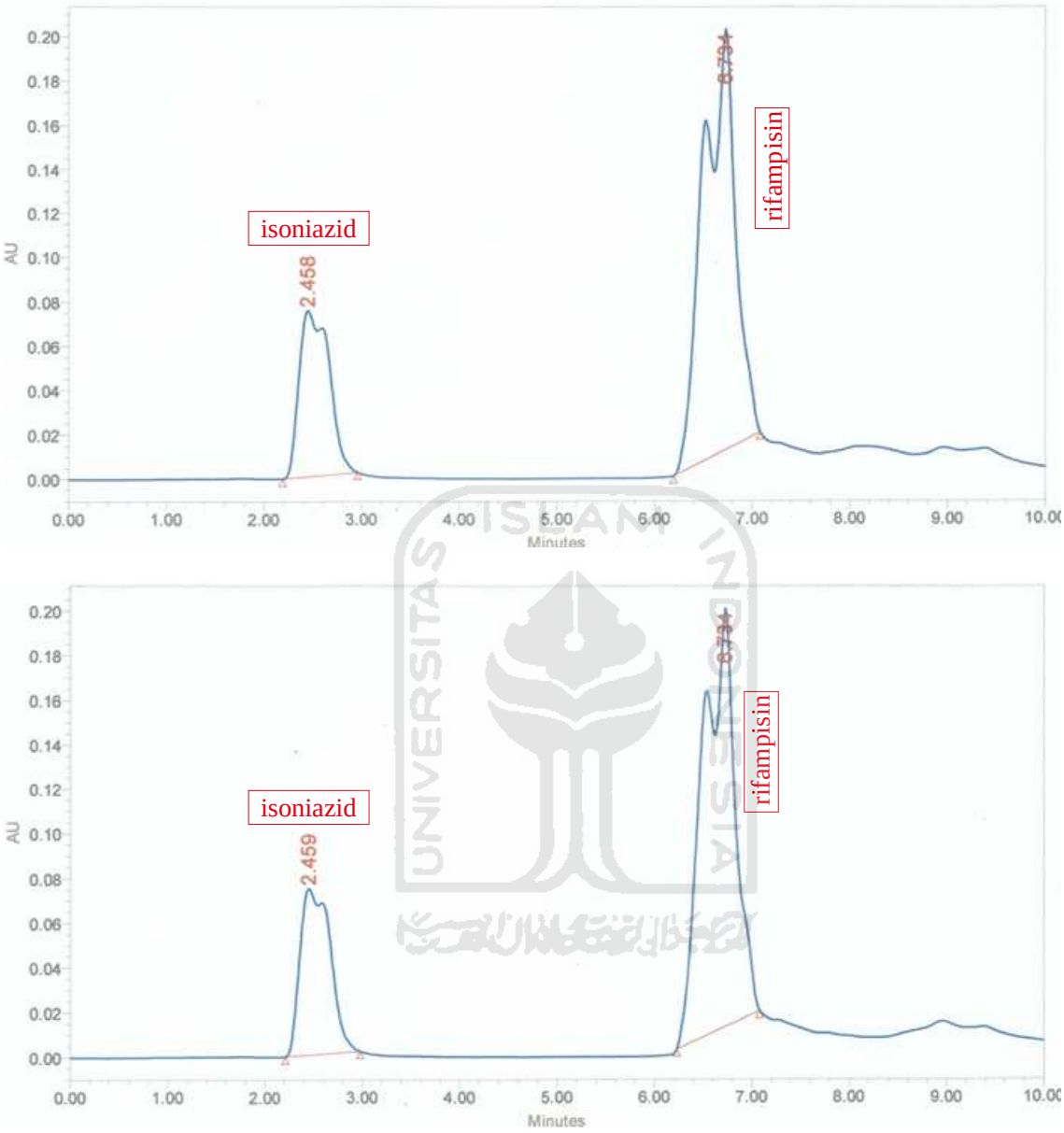
2. Kadar 70/105 ppm

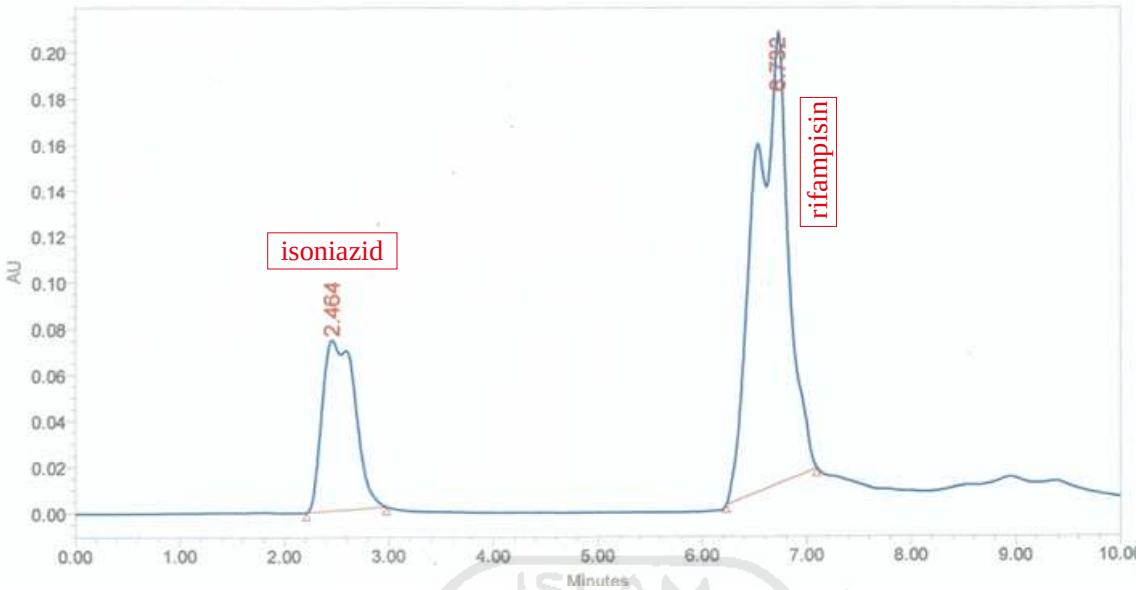



isoniazid
2.454
rifampisin
6.730
AU
Minutes


isoniazid
2.458
rifampisin
6.796
AU
Minutes

3. Kadar 90/135 ppm




isoniazid
rifampisin
2.464
6.732
AU
Minutes
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.14
0.16
0.18
0.20
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00

Lampiran 16: Foto beberapa alat yang digunakan dalam penelitian



Alat timbang



Ultrasonic



HPLC