

## ANALISIS CAMPURAN ISONIAZID, RIFAMPISIN DAN PIRAZINAMID DALAM SEDIAAN TABLET MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Aqnes Budiarti\* dan Risna Angella Putri Pamungkas

Farmasi Universitas Wahid Hasyim

Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang 50236.

\*Email: aqnesbudiarti@unwahas.ac.id

### Abstrak

Rifampisin, isoniazid dan pirazinamid merupakan obat anti tuberkulosis. Ketiga obat ini tersedia dalam bentuk tablet kombinasi. Penetapan kadar obat kombinasi memerlukan metode analisis yang serempak, salah satunya adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Tujuan penelitian ini adalah menghasilkan metode tervalidasi untuk menetapkan kadar rifampisin, isoniazid dan pirazinamid dalam sediaan tablet. Penetapan kadar isoniazid, rifampisin dan pirazinamid menggunakan KCKT merk Jasco dengan detektor UV. Fase diam yang digunakan adalah  $C_{18}$  dan fase gerak berupa campuran aquades: asetonitril: (7:25, v/v), pada panjang gelombang 280 nm. Uji validasi meliputi parameter presisi, akurasi, linieritas, selektivitas dan sensitivitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode memenuhi persyaratan parameter validasi. Uji presisi menghasilkan nilai RSD untuk isoniazid adalah 0,78%, rifampisin 0,53% dan pirazinamid 0,36%. Uji akurasi menghasilkan perolehan kembali 99,41-100,55% untuk isoniazid, 100,12-100,39% untuk rifampisin dan 100,42-100,71% untuk pirazinamid. Metode memiliki selektivitas yang baik. Metode linier untuk masing-masing zat aktif. Kadar terkecil yang dapat dideteksi untuk isoniazid; rifampisin dan pirazinamid masing – masing adalah 0,16; 0,58 dan 1,34  $\mu\text{g/mL}$ . Kadar terkecil yang dapat diukur untuk isoniazid; rifampisin dan pirazinamid masing – masing adalah 0,53; 1,22 dan 4,53  $\mu\text{g/mL}$ . Metode yang tervalidasi dapat digunakan untuk menetapkan kadar ketiga zat aktif dan memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan Farmakope Indonesia Edisi V.

**Kata kunci:** isoniazid, KCKT, pirazinamid, rifampisin, validasi, tablet

### 1. PENDAHULUAN

Rifampisin, isoniazid dan pirazinamid merupakan obat anti tuberkulosis lini pertama. Ketiga obat ini tersedia dalam bentuk kombinasi satu sediaan obat dengan dosis sesuai standar yang disebut sediaan *Fixed Dose Combination* (FDC). Bentuk sediaan didesain untuk mencegah terjadinya resistensi, khususnya pasien dengan tingkat kepatuhan minum obat rendah. Hal ini disebabkan karena pasien mengkonsumsi bermacam-macam obat dalam waktu cukup lama sehingga banyak pasien yang tidak dapat menyelesaikan pengobatan hingga tahap akhir (Peloquin, 2008).

Analisis obat terutama dalam bentuk campuran atau kombinasi memerlukan metode analisis yang dapat menetapkan kadar secara serempak, salah satunya adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Penetapan kadar rifampisin, isoniazid dan pirazinamid menurut Farmakope Indonesia Edisi IV dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri ultraviolet, kromatografi lapis tipis dan KCKT (Depkes RI, 1995). Metode KCKT memiliki sensitivitas tinggi, resolusinya baik, detektor yang sensitif sehingga mampu menganalisis berbagai sampel secara kualitatif maupun kuantitatif (Gandjar dan Rohman, 2010).

Stella (2011) telah melakukan validasi metode analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet 4-FDC menggunakan KCKT. Fase diam berupa  $C_{18}$  dan fase geraknya adalah kalium dihidrogen fosfat pH 6,2: asetonitril (99:1 dan 97:3) dengan kecepatan alir 1,00 mL/menit pada panjang gelombang 242 nm. Metode analisis memenuhi parameter validasi. Nurdianti (2016) menetapkan kadar rifampisin dan isoniazid dalam tablet 2-FDC menggunakan KCKT pada kecepatan alir 0,6 mL/menit dengan fase gerak aquades:asetonitril. Metode analisis yang digunakan telah memenuhi parameter validasi.

Validasi metode penetapan kadar rifampisin, isoniazid dan pirazinamid perlu dilakukan untuk menjamin metode tersebut sesuai untuk menganalisis ketiga zat aktif tersebut di dalam suatu sediaan. Validasi meliputi parameter presisi, akurasi, linieritas, selektivitas dan sensitivitas.

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan metode analisis tervalidasi guna menetapkan kadar rifampisin, isoniazid dan pirazinamid dalam sediaan tablet 3-FDC menggunakan KCKT.

## 2. METODOLOGI

### 2.1. Bahan

Baku pembanding rifampisin, isoniazid dan pirazinamid, metanol pro KCKT, aquades pro injeksi, tablet 3-FDC Pro TB 3 Kid (Phapros).

### 2.2. Alat

Seperangkat KCKT (Jasco), kolom C<sub>18</sub> lichrosper 100 (100 mm x 4,6 mm ID, 5 $\mu$ m), detektor UV (2070 plus), *software Ezchrom elite*, spektrometer UV-Vis (1800 Shimadzu), syringe, pH meter dan timbangan analitik.

### 2.3. Jalannya Penelitian

#### 2.3.1. Pembuatan larutan baku isoniazid, rifampisin dan pirazinamid

Baku pembanding isoniazid, rifampisin dan pirazinamid ditimbang seksama 10 mg kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, lalu dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

#### 2.3.2. Pembuatan fase gerak

Aquades dan asetonitril disaring dan dihilangkan gasnya. Komposisi fase gerak terdiri dari aquades: asetonitril 80:20;75:25 dan 70:30, v/v.

#### 2.3.3. Penentuan panjang gelombang untuk analisis

Larutan baku rifampisin, isoniazid dan pirazinamid masing-masing diambil 100  $\mu$ L dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL lalu ditambahkan fase gerak aquades: asetonitril (75:25 v/v) hingga tanda batas, disonifikasi selama 5 menit sampai homogen. Larutan standar rifampisin, isoniazid dan pirazinamid konsentrasi masing-masing 10 ppm dipindai spektrum serapan maksimumnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 200-400 nm.

#### 2.3.4. Optimasi fase gerak

Ketiga komposisi fase gerak digunakan untuk menganalisis sampel dengan laju alir 1,2 mL/menit. Selanjutnya dipilih fase gerak yang memberikan data terbaik.

#### 2.3.5. Pembuatan kurva baku

- Larutan stok baku isoniazid 1000  $\mu$ g/mL dipipet 10, 20, 30, 40, 50, 60  $\mu$ L dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL.
- Larutan stok rifampisin dipipet 15, 30, 45, 60, 75, 90  $\mu$ L dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL pada poin a.
- Larutan stok pirazinamid dipipet 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu$ L dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL pada poin a.
- Masing-masing labu takar ditambah fase gerak hasil optimasi sampai tanda batas dan diperoleh konsentrasi isoniazid 1, 2, 3, 4, 5, 6 ppm, rifampisin 1,5, 3, 4,5, 6, 7,5, 9 ppm dan pirazinamid 5, 10, 15, 20, 25, 30 ppm.
- Masing-masing larutan dideteksi pada panjang gelombang 280 nm dan laju alir 1,20 mL/menit.
- Berdasarkan kromatogram dibuat kurva baku berupa persamaan regresi linier dan faktor korelasinya

#### 2.3.6. Pembuatan Larutan Sampel Untuk Uji Validasi

Sebanyak 20 tablet 3-FDC dihitung bobot rata-ratanya, kemudian dihaluskan dan ditimbang sejumlah bobot tertentu setara rifampisin 75 mg, isoniazid 50 mg dan pirazinamid 150 mg. Sampel dimasukkan dalam labu ukur 50,0 mL, dilarutkan dalam fase gerak hingga tanda batas dengan bantuan sonikasi selama 30 menit. Larutan disentrifugasi selama 15 menit kemudian diambil larutan yang jernih.

#### 2.3.7. Validasi

- Uji Presisi (ketelitian)  
Larutan yang mengandung isoniazid, rifampisin dan pirazinamid 100  $\mu$ g/mL diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L ke alat KCKT pada kondisi optimum. Percobaan di replikasi dan tinggi puncak masing-masing dicatat. Selanjutnya dihitung presentase koefisien variasinya.
- Uji Akurasi (ketepatan)

Uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*). Sampel ditambah baku pembanding dengan konsentrasi kadar isoniazid, rifampisin dan pirazinamid sebesar 80%, 100%, 120%. Perolehan kembali dihitung dengan membandingkan jumlah rifampisin, isoniazid dan pirazinamid yang ditambahkan dengan jumlah yang terukur oleh metode.

c. Uji Linieritas

Uji dilakukan pada ketiga persamaan regresi linier yang diperoleh pada pembuatan kurva baku. Nilai korelasinya (nilai r) terbaik dianalisis linieritasnya.

d. Uji Selektivitas

Uji dilakukan terhadap kromatogram rifampisin, isoniazid dan pirazinamid. Ketiga puncak dan komponen lain dihitung nilai resolusinya.

e. Uji Sensitivitas

Uji terdiri dari uji batas deteksi (LOD) dan uji batas kuantifikasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantifikasi dihitung secara statistik menggunakan persamaan garis regresi linier yang diperoleh dari uji linieritas.

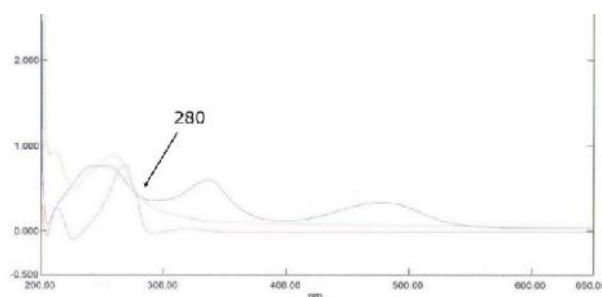
### 2.3.8. Penetapan kadar rifampisin, isoniazid dan pirazinamid dalam sediaan tablet 3-FDC

Sebanyak 30 tablet 3-FDC ditimbang dan dihitung bobot rata-ratanya. Sampel kemudian dihaluskan dan ditimbang. Keseluruhan sampel dimasukan ke labu ukur 1000,0 mL, dilarutkan dengan metanol dan ditambah air hingga tanda batas lalu disonifikasi selama 30 menit. Larutan disentrifugasi selama 15 menit kemudian diambil bagian yang jernih dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak hingga diperoleh konsentrasi tertentu. Larutan disuntikkan sebanyak 3 kali ke alat KCKT pada panjang gelombang hasil optimasi dengan laju alir 1,20 mL/menit.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Penentuan Panjang Gelombang untuk Analisis

Optimasi panjang gelombang isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dilakukan menggunakan spektrofotometri UV pada rentang 200-400 nm. Hasil *scanning* panjang gelombang masing-masing zat aktif didapatkan potongan titik isosbestik pada 280 nm dan digunakan untuk analisis menggunakan KCKT, terlihat pada gambar 1.

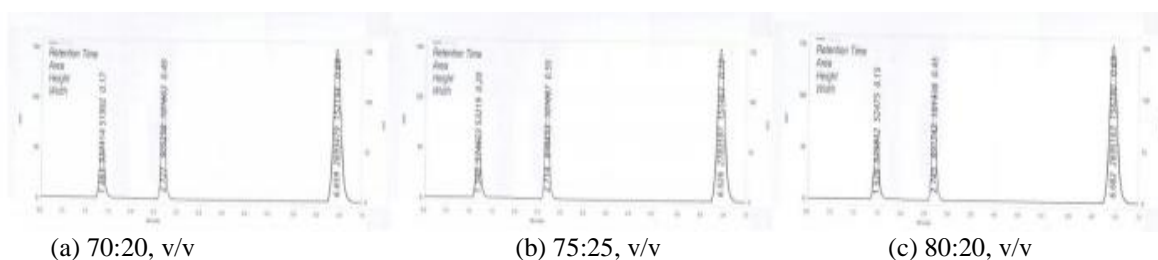


Gambar 1. Titik isosbestik panjang gelombang isoniazid, rifampisin dan pirazinamid

### 3.2. Optimasi Fase Gerak

Optimasi fase gerak dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi, resolusi dan luas puncak masing-masing analit yang dipisahkan dengan fase gerak masing-masing komposisi. Resolusi menandakan polaritas keseluruhan pelarut yang dapat memisahkan puncak analit secara sempurna sehingga tidak merusak hasil analisis. Resolusi dipengaruhi oleh faktor selektivitas yang dapat dicapai dengan merubah komposisi fase gerak (Snyder dkk., 1997).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fase gerak dengan perbandingan aquades:asetonitril (75:25, v/v) menghasilkan waktu retensi yang relatif cepat, luas puncak relatif sempit dan puncak yang dihasilkan simetris sehingga dipilih sebagai fase gerak untuk analisis. Hasil optimasi fase gerak dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Optimasi fase gerak campuran aquades dan asetonitril dengan tiga komposisi

### 3.3. Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan perubahan konsentrasi analit. Pembuatan kurva baku isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dilakukan tiga kali replikasi dan menghasilkan persamaan garis regresi paling baik yaitu untuk isoniazid adalah  $Y=125237x+72007,6$  dengan koefisien korelasi  $r=0,999$ , untuk rifampisin adalah  $Y=136324x+94349$  dengan koefisien korelasi  $r=0,999$  dan untuk pirazinamid adalah  $Y=128694x+13248$  dengan koefisien korelasi  $r=0,999$ .

### 3.4. Validasi Metode Analisis

#### 3.4.1. Presisi

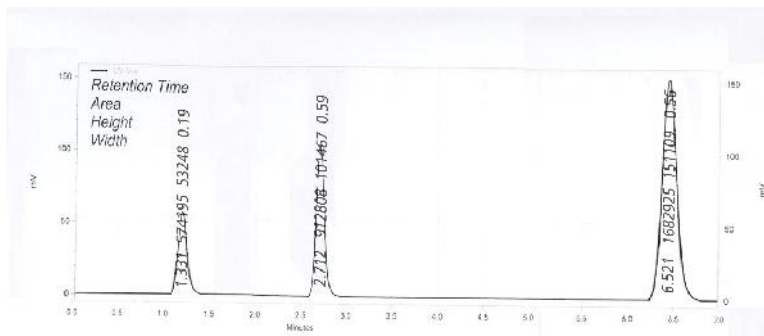
Presisi merupakan parameter yang menyatakan metode dapat menghasilkan sekumpulan data yang sama atau mendekati. Uji presisi dinyatakan sebagai keterulangan (*reapitability*) dan dilakukan terhadap larutan baku isoniazid 4µg/mL, larutan baku rifampisin 6µg/mL dan larutan baku pirazinamid 20µg/mL dengan replikasi 6 kali. Uji presisi menghasilkan nilai RSD untuk isoniazid adalah 0,78%, rifampisin 0,53% dan pirazinamid 0,36%. Hasil uji ketelitian memenuhi persyaratan nilai RSD yang dapat diterima yaitu kurang dari 2% (Harmita, 2004).

#### 3.4.2. Akurasi

Akurasi merupakan ukuran kedekatan hasil percobaan terhadap nilai sebenarnya. Uji akurasi pada penelitian ini dilakukan dengan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*) sejumlah bahan baku (80, 100, 120% dari kadar analit) dan masing-masing direplikasi sebanyak 3 kali. Uji akurasi menghasilkan perolehan kembali 99,41-100,55% untuk isoniazid, 100,12-100,39% untuk rifampisin dan 100,42-100,71% untuk pirazinamid. Hasil uji akurasi dapat diterima karena perolehan kembali yang umum untuk senyawa obat dalam campuran yaitu 98-102 % (Gandjar dan Rohman, 2012).

#### 3.4.3. Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas merupakan kemampuan metode untuk mengukur analit secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel. Selektivitas pada penelitian ini ditentukan berdasarkan nilai resolusi (R) antar puncak analit. Semakin besar nilai resolusi maka pemisahan komponen-komponen yang terelusi dengan waktu retensi yang berdekatan semakin efisien. Contoh kromatogram untuk uji selektivitas dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kromatogram campuran isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dalam sediaan tablet FDC.

Gambar 3 memperlihatkan tidak adanya komponen lain ikut terukur. Pemisahan isoniazid, rifampisin dan pirazinamid menghasilkan nilai  $R_1 = 3,48$  dan  $R_2 = 6,36$ . Kedua nilai memenuhi persyaratan pemisahan yang baik yaitu  $R > 2,00$  (Snyder dkk., 1997).

#### 3.4.4. Linieritas

Uji linieritas dilakukan pada enam seri konsentrasi larutan baku isoniazid, rifampisin dan pirazinamid. Uji linieritas didasarkan pada hubungan linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang ditetapkan dalam nilai  $r$ , nilai ini memenuhi syarat jika sama atau lebih dari 0,998 (Miller dan Miller, 2005). Nilai  $r$  dari ketiga persamaan garis linier memenuhi persyaratan sehingga metode analisis linier.

#### 3.4.5. Sensitivitas

Sensitivitas metode analisis dinyatakan dengan nilai LOD dan LOQ. Nilai LOD menyatakan kadar terkecil yang dapat dideteksi oleh metode. Nilai LOQ menyatakan kadar terkecil yang dapat diukur oleh metode. Nilai LOD untuk isoniazid, rifampisin dan pirazinamid masing – masing adalah 0,16; 0,58 dan 1,34  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai LOQ untuk isoniazid, rifampisin dan pirazinamid masing – masing adalah 0,53; 1,22 dan 4,53  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.5. Penetapan Kadar Isoniazid, Rifampisin dan Pirazinamid

Penetapan kadar isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dalam sediaan tablet 3-FDC disajikan pada tabel I.

**Tabel I. Hasil penetapan kadar isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dalam tablet FDC**

Analit	Luas puncak kromatogram	Kadar per tablet (mg)	Kandungan (%)	Rata-rata	SD	RSD (%)
Isoniazid	574195	50,12	100,25	99,92	0,47	.0047
	571274	49,83	99,66			
	570577	49,76	99,52			
	576572	50,36	100,72			
	570735	49,78	99,56			
Rifampisin	572001	49,90	99,81	99,87	0,17	.0017
	912808	75,05	100,06			
	913032	75,07	100,09			
	909599	74,75	99,67			
	910092	74,80	99,73			
Pirazinamid	910518	74,84	99,78	100,25	0,17	.0017
	911076	74,89	99,85			
	1682925	150,60	100,40			
	1681865	150,50	100,33			
	1681348	150,44	100,30			
1675488	149,88	99,92				
1680566	150,37	100,25				
1681845	150,493	100,33				

Berdasarkan tabel I, diperoleh kandungan obat isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dalam tablet kombinasi memenuhi persyaratan pada Farmakope Indonesia V yaitu tidak kurang dari 90,00% dan tidak lebih dari 110,00% dari jumlah yang tertera pada etiket.

## 4. KESIMPULAN

- Validasi metode penetapan kadar isoniazid, rifampisin dan pirazinamid menggunakan KCKT dengan fase diam  $C_{18}$  dan fase gerak berupa campuran aquades: asetonitril (75: 25 v/v) dengan laju alir 1,20 mL/menit pada panjang gelombang 280 nm dapat dilakukan dan hasilnya memenuhi persyaratan validasi.
- Metode analisis tervalidasi pada poin 1 dapat diaplikasikan untuk menetapkan kadar campuran isoniazid, rifampisin dan pirazinamid dalam sediaan tablet dan memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan Farmakope Indonesia V.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Depkes RI., (1995), *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Depkes RI., (2014), *Farmakope Indonesia*, Edisi V, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Gandjar, I.G., and Rohman, A., (2010), *Kimia Farmasi Analisis*, Cetakan ketujuh, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, pp. 459.
- Gandjar, I.G., dan Rohman A., (2012), *Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi*, Cetakan I, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, pp. 315-317.
- Harmita, (2004), *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya*, Majalah Ilmu Kefarmasian., 1, No. 3, pp. 117-135.
- Miller, J.C and Miller, J.N., (2005), *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5<sup>th</sup> Edition, Pearson Education Limited, Edinburg Gate, England, pp. 111.
- Nurdianti, (2014), Validasi Metode Analisis Rifampisin dan Isoniazid Dalam Tablet 2 Fixed Dose Combination Dengan Metode KCKT, *Skripsi*, Politeknik Kesehatan Bandung, Bandung.
- Peloquin, C.A., (2008), *Tuberculosis, Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 7<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, USA.
- Snyder, R.L., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., (1997), *Practical KCKT Method Development*, 2nd Edition, John Wiley & Son, Inc., New York, pp. 686-697.
- Stella, (2011), Optimasi dan Validasi Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid Dalam Tablet 4 Fixed Dose Combination (4FDC) dan Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, *Skripsi*, Universitas Indonesia, Depok.