



UNIVERSITAS INDONESIA

**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

**STELLA
0706265024**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**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

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**STELLA
0706265024**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Stella
NPM : 0706265024
Tanda Tangan : 
Tanggal : 7 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Stella
NPM : 0706265024
Program Studi : S1 Farmasi
Judul Skripsi : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid dalam Tablet 4 *Fixed Dose Combination* (4FDC) dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian dari persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Harmita, Apt.

()

Pembimbing II: Prof. Dr. Yuhdiana Harahap, MS., Apt.

()

Penguji I : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt.

()

Penguji II : Dra. Retnosari Andrajati, MS., Ph.D., Apt.

()

Penguji III : Dr. Katrin, MS., Apt.

()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 7 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul optimasi dan validasi metode analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet dan plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

Pada penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mengarahkan, yaitu kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI beserta segenap staf pengajar Departemen Farmasi.
2. Bapak Dr. Harmita, Apt., selaku pembimbing I dan pembimbing akademik yang telah dengan sabar dan tulus mengarahkan, memberikan nasehat, bantuan, semangat, dan perhatian dari semasa perkuliahan, penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt., selaku pembimbing II dan Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi yang telah memberikan pengajaran, bimbingan, pengarahan, semangat, dan pengalaman selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini, serta selaku Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi .
4. Bapak Drs. Hayun, MS, Apt., selaku Ketua Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif serta Bapak Rustam Paun selaku Laboran Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan sebagian besar penelitian di laboratorium yang bersangkutan serta atas nasehat dan bantuan yang diberikan.
5. Laboran dan teman-teman di Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi beserta segenap anggotanya, antara lain Kak Rina, Kak Utami, Kak Wulan dan Ibu Ami atas saran serta bantuan yang diberikan.

6. Ibu Wulan dari PT. Ditek Jaya, Ibu Lisda dari PT. Kimia Farma, dan Bapak Ichsan dari PT. Bayer Indonesia, yang telah memberikan bantuan bahan baku untuk keberlangsungan penelitian penulis.
7. Keluargaku tersayang, yang tidak putus memberikan dukungan moril, hiburan, kekuatan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
8. Tommy Jeremia Kangdra, B.Eng, yang telah dengan setia mendengarkan keluh kesah penulis selama masa perkuliahan hingga tersusunnya skripsi ini.
9. Teman-teman seperjuanganku 2007, kakak serta adik kelas atas waktu serta kesediaannya mendengarkan keluhan penulis, bantuan, memberikan saran dan menyemangati penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
10. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih belum sempurna sehingga penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Penulis menerima dengan tangan terbuka segala saran maupun kritik yang bersifat membangun baik bagi penelitian maupun penyusunan skripsi ini.

Penulis
2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Stella
NPM : 0706265024
Program Studi : S1 Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Optimasi dan Validasi Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid dalam Tablet 4
Fixed Dose Combination (4FDC) dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair
Kinerja Tinggi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 7 Juli 2011

Yang menyatakan,



(Stella)

vii

ABSTRAK

Nama : Stella
Program Studi : Farmasi
Judul : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid dalam Tablet 4 *Fixed Dose Combination* (4FDC) dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Pengobatan tuberkulosis biasanya menggunakan obat kombinasi yang disebut *fixed dose combination* (FDC) yang dapat terdiri dari 2 atau 4 zat aktif yaitu isoniazid (INH), pirazinamid (PZA), rifampisin (RIF), dan etambutol (ETA). Dikarenakan toksiknya obat yang digunakan, maka diperlukan suatu metode analisis untuk mengetahui kadar obat dalam darah. Metode kromatografi cair kinerja tinggi yang sederhana dan reproduksibel telah dikembangkan untuk penentuan kadar INH dan PZA secara simultan di dalam tablet dan plasma manusia secara *in vitro*. Sistem kromatografi terdiri dari kolom Shimpack[®] C₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 μm) dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) untuk analisis di dalam tablet dan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) untuk analisis pada plasma manusia secara *in vitro*. Larutan dideteksi pada panjang gelombang 242 nm dan laju alir 1,0 mL/menit. Sebagai baku dalam digunakan asam nikotinat. Pada validasi tablet, metode dinyatakan linear dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk INH dan PZA berturut-turut 0,9992 dan 0,9992; presisi dengan nilai koefisien variasi (KV) 1,46% dan 0,92%; serta akurat dengan nilai perolehan kembali untuk 3 konsentrasi sebesar 98% - 102%. Proses ekstraksi plasma dilakukan dengan metode pengendapan protein menggunakan asetonitril kemudian dikocok dengan vortex selama 1 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Supernatan kemudian diuapkan dan direkonstitusi dengan fase gerak. Pada validasi plasma, nilai perolehan kembali rata-rata untuk INH dan PZA berturut-turut 99,79% dan 99,08% serta nilai LLOQ berturut-turut 4,74 μg/mL dan 16,00 μg/mL. Metode ini juga memenuhi kriteria akurasi dan presisi intra hari dan antar hari selama 5 hari dengan % *diff* tidak melampaui ± 20% pada LLOQ dan ± 15% pada konsentrasi selain LLOQ. Pada uji stabilitas, INH dan PZA dalam plasma dinyatakan stabil selama 7 hari.

Kata kunci : isoniazid, KCKT, pirazinamid, validasi
xiii + 99 halaman ; 24 tabel; 22 gambar; 12 lampiran
Daftar pustaka : 26 (1982-2010)

ABSTRACT

Name : Stella
Study Program : Pharmacy
Title : Optimization and Validation of Analytical Method of Isoniazid and Pyrazinamide in Tablet 4 Fixed Dose Combination (4FDC) and Plasma In Vitro by High Performance Liquid Chromatography

Treatments for tuberculosis commonly use combination of drugs called fixed dose combination (FDC). It consists of 2 or 4 active ingredient pharmaceutical namely isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA), rifampicin (RIF), and ethambutol (ETA). Due to the drug toxicity, analytical method is required to determine the concentration of antituberculosis drug in human plasma. A simple and reproducible high-performance liquid chromatography method was developed for simultaneous determination of INH and PZA in the tablet and human plasma. Chromatography was performed on a Shimpack[®] C₁₈ column (250 × 4.6 mm, 5 μm) under isocratic elution with potassium dihydrogen phosphate pH 6.2-acetonitrile (97:3) for tablet and potassium dihydrogen phosphate pH 6.2-acetonitrile (99:1) for analytical in human plasma. Detection was made at 242 nm and analysis was run at a flow-rate of 1.0 ml/min. Nicotinic acid was used as internal standard. In tablet validation, the calibration curve was linear by r values 0.9992 and 0.9992, precision by coefficient of variation (CV) were 1.46% and 0.92% also accurate by % recovery for 3 concentrations were 98% - 102% for INH and PZA, respectively. Plasma extraction was done by deproteination with acetonitrile, mix with vortex for 1 minute, then centrifuge it on 10000 rpm for 5 minutes. The residue was evaporated and reconstituted in eluen. In plasma validation, the recovery was 99.79% and 99.08% for INH and PZA, respectively. The lower limit of quantification (LLOQ) in plasma was 4.74 μg/ml and 16.00 μg/ml for INH and PZA, respectively. The method also fulfill the criteria for accuracy and precision intra and inter day by % *diff* values not exceed ± 20% for LLOQ and ± 15% for concentrations except LLOQ. On the stability study, INH and PZA in plasma is pronounced to be stable for 7 days.

Keywords : HPLC, isoniazid, pyrazinamide, validation
xiii + 99 pages ; 24 tables; 22 figures; 12 appendices
Bibliography : 26 (1982-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Zat aktif.....	3
2.2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	9
2.3 Validasi Metode Analisis.....	10
2.4 Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid.....	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
3.2 Alat dan Bahan.....	18
3.3 Tahapan Penelitian.....	19
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis.....	28
4.2 Optimasi Metode Analisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid.....	28
4.3 Uji Kesesuaian Sistem.....	30
4.4 Validasi Metode Analisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Tablet.....	30
4.5 Pengukuran Kadar Isoniazid dan Pirazinamid dalam Sampel Tablet.....	33
4.6 Penyiapan Sampel Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Plasma.....	34
4.7 Validasi Metode Bioanalisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Plasma <i>In Vitro</i>	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41
DAFTAR SINGKATAN.....	99

DAFTAR TABEL

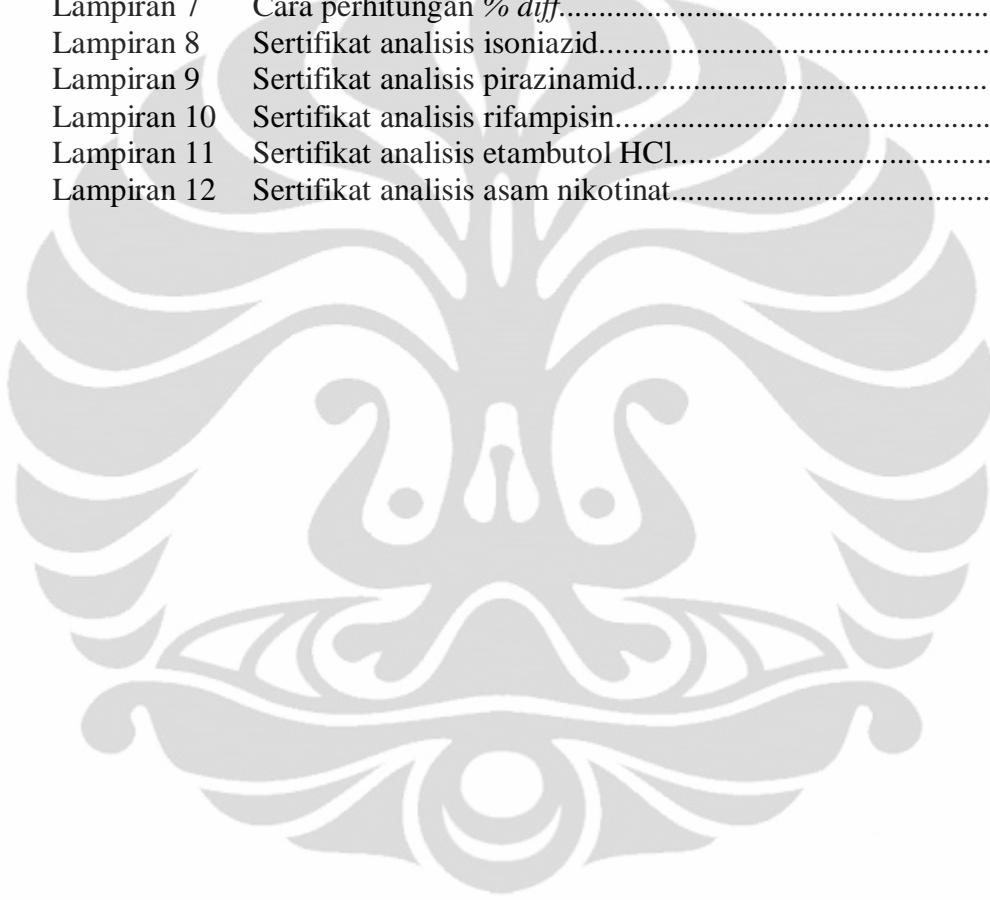
Tabel 2.1	Program Gradien.....	16
Tabel 4.1	Data hasil pemilihan fase gerak untuk analisis.....	44
Tabel 4.2	Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam.....	45
Tabel 4.3	Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam.....	45
Tabel 4.4	Data hasil uji pemilihan laju alir untuk analisis.....	46
Tabel 4.5	Data hasil uji pemilihan laju alir untuk analisis.....	46
Tabel 4.6	Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikkan.....	47
Tabel 4.7	Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikkan.....	47
Tabel 4.8	Data hasil kurva kalibrasi standar isoniazid dan pirazinamid.....	48
Tabel 4.9	Data hasil perhitungan akurasi isoniazid dan pirazinamid dalam tablet.....	49
Tabel 4.10	Data hasil perhitungan presisi isoniazid dan pirazinamid dalam tablet.....	50
Tabel 4.11	Data hasil pengukuran kadar isoniazid dan pirazinamid dalam sampel tablet.....	51
Tabel 4.12	Data hasil penentuan nilai LLOQ.....	52
Tabel 4.13	Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ.....	53
Tabel 4.14	Data hasil pengukuran kurva kalibrasi campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma.....	54
Tabel 4.15	(A)Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari isoniazid.....	55
	(B)Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari pirazinamid.....	56
Tabel 4.16	Data hasil presisi dan akurasi intra hari.....	57
Tabel 4.17	Data hasil akurasi dan presisi antar hari isoniazid.....	58
Tabel 4.18	Data hasil akurasi dan presisi antar hari pirazinamid.....	62
Tabel 4.19	Data hasil uji perolehan kembali.....	65
Tabel 4.20	Data uji stabilitas beku dan cair.....	66
Tabel 4.21	Data hasil uji stabilitas temperatur jangka pendek.....	67
Tabel 4.22	Data hasil uji stabilitas jangka panjang.....	68
Tabel 4.23	Data hasil uji stabilitas larutan stok campuran isoniazid dan pirazinamid.....	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus struktur isoniazid.....	3
Gambar 2.2	Rumus struktur pirazinamid.....	3
Gambar 2.3	Rumus struktur rifampisin.....	4
Gambar 2.4	Rumus struktur etambutol.....	5
Gambar 2.5	Rumus struktur asam nikotinat.....	5
Gambar 4.1	Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).....	70
Gambar 4.2	Spektrum serapan isoniazid (A), pirazinamid (B), dan asam nikotinat (C) pada spektrofotometer.....	71
Gambar 4.3	Kromatografi larutan standar isoniazid (A).....	72
Gambar 4.4	Kromatogram larutan standar isoniazid (A).....	73
Gambar 4.5	Kromatogram larutan standar pirazinamid (A).....	74
Gambar 4.6	Kromatogram larutan standar pirazinamid (A).....	75
Gambar 4.7	Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A).....	76
Gambar 4.8	Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A).....	77
Gambar 4.9	Kromatogram larutan isoniazid (A) dan pirazinamid (B) dengan adanya rifampisin dan etambutol HCl.....	78
Gambar 4.10	Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A), isoniazid (B), dan pirazinamid (C).....	79
Gambar 4.11	Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A), isoniazid (B), dan pirazinamid (C).....	80
Gambar 4.12	Kromatogram hasil ekstraksi plasebo tablet.....	81
Gambar 4.13	Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung isoniazid (A) dan pirazinamid (B).....	82
Gambar 4.14	Kromatogram hasil uji stres.....	83
Gambar 4.15	Kromatogram ekstrak plasma kosong.....	84
Gambar 4.16	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan isoniazid (B) dan pirazinamid (C) pada konsentrasi LLOQ dan asam nikotinat (A) sebagai baku dalam.....	85
Gambar 4.17	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan isoniazid (B) dan pirazinamid (C) pada konsentrasi tinggi dan asam nikotinat (A) sebagai baku dalam.....	86

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara memperoleh efisiensi kolom.....	87
Lampiran 2	Cara memperoleh resolusi.....	88
Lampiran 3	Cara memperoleh persamaan garis linear.....	89
Lampiran 4	Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantisasi.....	90
Lampiran 5	Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	91
Lampiran 6	Cara perhitungan koefisien variasi.....	92
Lampiran 7	Cara perhitungan % <i>diff.</i>	93
Lampiran 8	Sertifikat analisis isoniazid.....	94
Lampiran 9	Sertifikat analisis pirazinamid.....	95
Lampiran 10	Sertifikat analisis rifampisin.....	96
Lampiran 11	Sertifikat analisis etambutol HCl.....	97
Lampiran 12	Sertifikat analisis asam nikotinat.....	98



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis adalah salah satu penyakit yang disebabkan karena infeksi dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Chuluq, 2004). Saat ini, kasus tuberkulosis di Indonesia menempati urutan ketiga setelah India dan Cina sehingga tuberkulosis menjadi prioritas kesehatan bagi dunia (WHO, 2010). Tuberkulosis juga merupakan infeksi oportunistik yang paling sering terjadi pada pasien HIV di seluruh dunia sehingga insiden tuberkulosis meningkat di negara yang prevalensi infeksi HIV nya meningkat (WHO, 2010).

Obat antituberkulosis (OAT) dibedakan atas obat utama dan obat cadangan. Obat utama antituberkulosis adalah isoniazid (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (ETA), rifampisin (RIF) dan streptomisin, sedangkan yang termasuk obat cadangan yaitu asam p-aminosalisilat, sikloserin, kapreomisin, kanamisin dan tetrasiklin (Suarni, E., 2006). WHO merekomendasikan regimen pengobatan didasarkan atas keparahan serta riwayat dari pengobatan tuberkulosis sebelumnya.

Pengobatan tuberkulosis biasanya menggunakan obat kombinasi. Terapi kombinasi digunakan karena cepatnya kuman resisten terhadap masing-masing OAT serta supaya semua kuman termasuk yang dorman dapat dibunuh. Selain itu efek sampingnya lebih ringan karena digunakan dosis kecil (Suarni, E., 2006). Kombinasi dari beberapa macam OAT disebut *fixed dose combination* (FDC). Tablet FDC ada yang terdiri dari 2 maupun 4 zat aktif. Tablet 4FDC terdiri dari rifampisin, isoniazid, pirazinamid, dan etambutol HCl.

Sebagian besar obat antituberkulosis dapat diterima dalam terapi namun semuanya mempunyai efek toksik potensial, terlebih pada pasien usia lanjut dan orang dewasa bertubuh kecil (Istiantoro & Setiabudy, 2007). Karena itu pemantauan (*therapeutic drug monitoring*) obat dalam darah diperlukan untuk mengoptimasi terapi tuberkulosis (Peloquin, C.A., 2008). Pada beberapa kasus, TDM diperlukan pada pasien dengan gangguan hepar dan ginjal karena dikhawatirkan bahaya toksisitasnya, dan pada pasien AIDS karena obat sering kali mengalami gangguan absorpsi sehingga pengobatan tidak efektif (Peloquin, C.A.,

2008). Untuk memonitor kadar obat dibutuhkan metode analisis yang valid dan metode uji tersebut harus divalidasi sesuai aturan yang ditetapkan yang mengacu pada *Food and Drug Administration* (FDA).

Sejak tahun 1980, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) digunakan untuk analisis obat dalam darah (Mallett, D. N., 2004). Isoniazid, pirazinamid, dan rifampisin memiliki gugus kromofor sehingga untuk analisis dapat langsung menggunakan KCKT. Aktivitas atau potensi rifampisin ditentukan secara mikrobiologi melalui uji potensi sehingga tidak diikutsertakan dalam analisis pada penelitian ini. Etambutol tidak memiliki gugus kromofor maka analisisnya tidak dapat langsung dengan KCKT. Oleh sebab itu dalam penelitian ini, baik rifampisin dan etambutol hidroklorida tidak diikutsertakan.

Penelitian sebelumnya telah menetapkan kadar pirazinamid dalam *in vivo* dengan menggunakan KCKT fase terbalik dan detektor UV-Vis (Revankar, S.N., 1994), menetapkan isoniazid secara *in vivo* menggunakan KCKT fase terbalik dan detektor UV-Vis (Fanina, S., 2007), menentukan kadar isoniazid dan asetilisoniazid (metabolit) dalam plasma menggunakan KCKT fase gerak gradien dan detektor UV-Vis (Holdiness, M.R., 1982), serta menentukan rifampisin, isoniazid, dan pirazinamid dalam plasma menggunakan KCKT dengan detektor *diode array* (Unsalan, S, dkk, 2005). Sedangkan analisis campuran isoniazid dan pirazinamid masih sedikit, oleh sebab itu pada penelitian ini akan dilakukan optimasi analisis dari isoniazid dan pirazinamid dengan menggunakan KCKT fase terbalik dan detektor UV-Vis.

1.2 Tujuan Penelitian

- 1.2.1 Memperoleh kondisi optimasi untuk analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet dan plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.
- 1.2.2 Memperoleh metode yang valid untuk analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet dan plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.

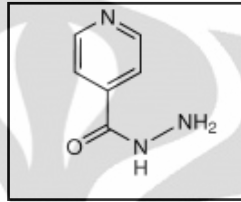
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Zat Aktif

2.1.1 Monografi

2.1.1.1 Isoniazid (DepKes, 1995) (Martindale, 2007) (Clarke, 2005)

Isoniazid memiliki struktur kimia sebagai berikut:



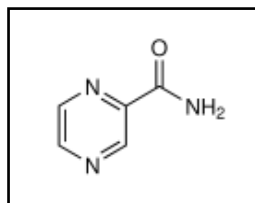
[Sumber: Martindale 35, 2007]

Gambar 2.1. Rumus struktur isoniazid

Nama dagang	: Inh Ciba®, Inoxin®, Kapedoxin®
Rumus molekul	: C ₆ H ₇ N ₃ O
Berat molekul	: 137,1 g/mol
Sinonim	: Isoniazida; Isoniazidum; <i>Isonicotinic Acid Hydrazide</i>
Fungsi	: Antituberkulosis
Organoleptis	: Putih, tidak berwarna, kristal tidak berbau
Kelarutan	: Larut dalam 8 bagian air dan 50 bagian alkohol, sedikit larut dalam kloroform

2.1.1.2 Pirazinamid (DepKes, 1995) (Martindale, 2007) (Clarke, 2005)

Pirazinamid memiliki struktur kimia sebagai berikut:



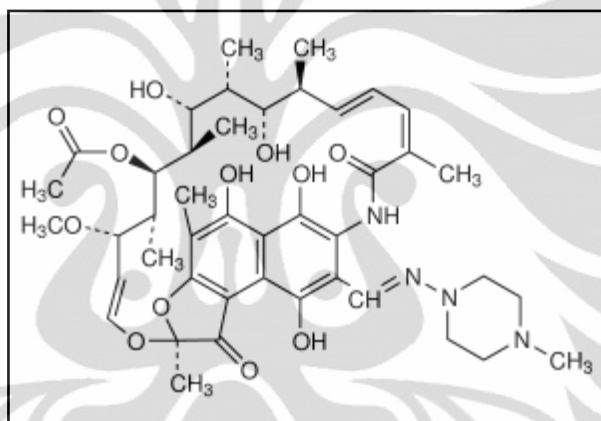
[Sumber: Martindale 35, 2007]

Gambar 2.2 Rumus struktur pirazinamid

Nama dagang	: Pezeta-Ciba®, Sanazet®, Neotibi®
Rumus molekul	: $C_5H_5N_3O$
Berat molekul	: 123,1 g/mol
Sinonim	: Pyrazinamidum; <i>Pyrazinoic Acid Amide</i>
Fungsi	: Antituberkulosis
Organoleptis	: Putih, tidak berbau, bubuk kristal
Kelarutan	: Larut dalam 67 bagian air, dalam 175 alkohol absolut, dan 135 dalam kloroform

2.1.1.3 Rifampisin (DepKes, 1995) (Martindale, 2007) (Clarke, 2005)

Rifampisin memiliki struktur kimia sebagai berikut:



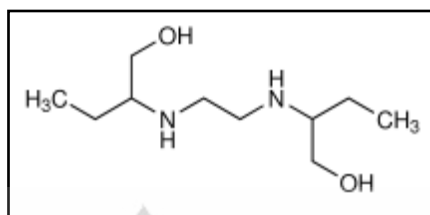
[Sumber: Martindale 35, 2007]

Gambar 2.3. Rumus struktur rifampisin

Rumus molekul	: $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$
Berat molekul	: 822,9 g/mol
Sinonim	: Rifampin, Rifampicina, Rifaldazine
Organoleptis	: Serbuk merah coklat
Kelarutan	: Sedikit larut dalam air, alkohol, dan aseton. Larut dalam metanol

2.1.1.4 Etambutol HCl (DepKes, 1995) (Martindale 35, 2007) (Clarke, 2005)

Etambutol HCl memiliki struktur kimia sebagai berikut:



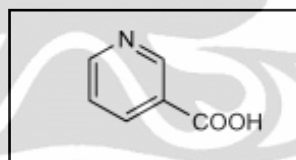
[Sumber: Martindale 35, 2007]

Gambar 2.4. Rumus struktur etambutol

Rumus molekul	: $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$
Berat molekul	: 277,2 g/mol
Organoleptis	: Serbuk kristal putih
Kelarutan	: Larut dalam 1 bagian air, 4 bagian etanol, dan 9 bagian metanol

2.1.1.5 Asam Nikotinat (Martindale 35, 2007) (Clarke, 2005)

Asam Nikotinat memiliki struktur kimia sebagai berikut:



[Sumber: Martindale 35, 2007]

Gambar 2.5. Rumus struktur asam nikotinat

Nama dagang	: Neuroboran®
Rumus molekul	: $C_6H_5NO_2$
Berat molekul	: 123,1 g/mol
Sinonim	: <i>Acidum nicotinum</i> , niacin
Organoleptis	: Serbuk kritical putih, tidak berbau
Kelarutan	: Larut dalam 60 bagian air, larut dalam air panas, alkohol, tidak larut dalam eter

2.1.2 Farmakologi

Isoniazid menghambat jalur biosintesis dari asam mikolat dengan menghambat pembentukan rantai asam lemak yang sangat panjang yang merupakan bentuk awal molekul asam mikolat (Istiantoro & Setiabudy, 2007). Isoniazid secara *in vitro* memiliki kadar hambat minimum sekitar 0,025-0,05 µg/mL. Organisme yang rentan terhadap isoniazid adalah *Mycobacterium tuberculosis* dan menghambat beberapa strain *M. kansasii*. Efek bakterisidnya hanya terlihat pada kuman yang sedang tumbuh aktif (Istiantoro & Setiabudy, 2007) dan pada bakteri yang semi dorman, isoniazid bersifat bakteriostatik (Martindale 35, 2007).

Efek nonterapi dari isoniazid adalah hipersensitivitas, reaksi hematologik, neuritis perifer, kerusakan hati, dan lain-lain (Istiantoro & Setiabudy, 2007). Efek samping yang terpenting adalah defisiensi piridoksin yang mengakibatkan neuritis perifer. Piridoksin HCl 10-50 mg biasanya diberikan sebagai profilaksis dari neuritis perifer dengan penggunaan isoniazid (Martindale 35, 2007).

Sampai saat ini, isoniazid merupakan salah satu dari obat antituberkulosis yang efektif namun penggunaannya secara tunggal akan meningkatkan resiko resistensi (Wolff, M. E., 1994). Oleh sebab itu, penggunaan isoniazid biasanya digabungkan dengan obat antituberkulosis lainnya seperti rifampisin, pirazinamid, dan etambutol untuk menghindari terjadinya resistensi (Istiantoro & Setiabudy, 2007).

Pirazinamid menunjukkan aktivitas bakterisid setelah diubah oleh enzim pirazinamidase menjadi asam pirazinoat dalam intraseluler (Wolff, M. E., 1994). Secara *in vitro*, dibutuhkan kadar 5-20 µg/mL pada pH 5,5 untuk melawan *Mycobacterium tuberculosis* (Wolff, M. E., 1994). Adanya asam pirazinoat dalam makrofag akan menurunkan pH menjadi level pH toksik bagi tuberkel bacili (Martindale 35, 2007).

Efek nonterapi dari pirazinamid yang paling umum dan serius adalah kelainan hati dan hiperurisemia. Pada dosis 3 g per hari, gejala penyakit hati muncul kira-kira 15%, dengan ikterus pada 2-3% penderita dan kematian akibat nekrosis hati pada beberapa kasus (Istiantoro & Setiabudy, 2007). Efek samping lainnya adalah artralgia, anoreksia, mual dan muntah.

Rifampisin merupakan antibiotik golongan makrosiklik dan dihasilkan oleh *Streptomyces mediterranei*. Rifampisin memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan berbagai kuman gram positif, kokus gram negatif, beberapa enterobakteri, mikobakteria, serta *chlamydia*. Efek samping utama dari rifampisin adalah memberikan warna merah pada urin, keringat, dan air mata. Efek samping lainnya meliputi *rash*, trombositopenia, nefritis dan dapat menyebabkan *cholestatic jaundice* dan hepatitis sementara (Katzung, 2005).

Mekanisme kerja etambutol HCl sebagai obat antituberkulosis adalah dengan menghambat sintesis metabolit sel sehingga metabolisme sel terhambat dan sel mati. Efek samping yang penting adalah gangguan penglihatan baik, kemampuan membedakan warna, dan mengecilnya lapang pandangan (Istiantoro & Setiabudy, 2007).

2.1.3 Farmakokinetika

Isoniazid diabsorpsi secara cepat lewat saluran pencernaan dan menghasilkan kadar puncak pada plasma sebesar 3-5 µg/mL dalam 1-2 jam setelah pemberian oral 300 mg isoniazid (Katzung, 2005). Dosis isoniazid adalah 5 mg/kg per hari dengan dosis maksimum 300 mg. Isoniazid terdifusi secara cepat menuju seluruh cairan tubuh seperti serebrospinal, pleura, jaringan, organ, dan ekskreta (saliva, sputum, feses). Isoniazid tidak terikat ke plasma protein dan ditransportasikan melalui plasenta dan juga melalui kelenjar susu. Sekitar 75% isoniazid diekskresikan di urin dalam 24 jam, sebagian besar dalam bentuk metabolitnya. Waktu paruh dari isoniazid pada pasien dengan fungsi hati dan ginjal yang normal bervariasi dari 1 hingga 6 jam, tergantung dari kecepatan metabolisme (Martindale 35, 2007).

Isoniazid dimetabolisme melalui reaksi asetilasi di hati menjadi asetil isoniazid, yang kemudian mengalami hidrolisis menjadi asam isonikotinat dan monoasetilhidrazin. Asam isonikotinat kemudian berkonjugasi dengan glisin menjadi isonikotinil glisin. Kecepatan asetilasi pada tiap orang berbeda-beda bergantung dari genetiknya, dibedakan menjadi asetilator cepat atau lambat. Waktu paruh isoniazid pada asetilator cepat berkisar dari 45 sampai 80 menit, sedang pada asetilator lambat sekitar 140 sampai 200 menit. Dengan demikian,

Universitas Indonesia

pada asetilator lambat cenderung mengakumulasi kadar isoniazid plasma yang tinggi dibanding dengan asetilator cepat (Wilson & Gisvold, 1982).

Isoniazid termasuk obat yang menghambat sitokrom P-450. Isoniazid dilaporkan menghambat metabolisme dari beberapa obat seperti obat antikonvulsan (seperti karbamazepin, fenitoin, primidone, asam valproat), benzodiazepin (contoh: diazepam), haloperidol, ketokonazole, teofilin, dan warfarin (Martindale 35, 2007).

Pirazinamid diabsorpsi secara cepat dari saluran pencernaan dan dosis untuk dewasa adalah 15-30 mg/kg secara oral dalam 3 atau 4 dosis terbagi, dan dosis maksimum adalah 3 g per hari (Goodman & Gillman, 1996). Pada pemberian 25 mg/kg per hari akan memberikan konsentrasi 30-50 µg/mL dalam plasma setelah 1-2 jam (Katzung, 2005). Pirazinamid didistribusikan secara luas ke berbagai jaringan tubuh dan cairan termasuk hati, paru-paru, serta cairan serebrospinal. Pirazinamid terikat 10% ke plasma protein (Martindale 35, 2007). Waktu paruh dari pirazinamid pada pasien dengan fungsi ginjal dan hati yang normal adalah 8-11 jam (Katzung, 2005) dan dapat meningkat pada pasien dengan gangguan fungsi ginjal dan hati (Martindale 35, 2007).

Pirazinamid dimetabolisme di hati menjadi metabolit aktifnya, asam pirazinoat. Asam pirazinoat dihidroksilasi menjadi produk metabolit utama yaitu asam 5-hidroksipirazinoat. Dalam 24 jam, 70% dari dosis oral pirazinamid diekskresikan di urin, terutama melalui filtrasi glomerulus (Martindale 35, 2007).

Rifampisin menghasilkan kadar puncak dalam plasma setelah 2-4 jam setelah pemberian per oral dan setelah pemberian dosis 600 mg akan menghasilkan 7 µg/mL (Goodman & Gilman, 1996). Setelah diserap dari saluran cerna akan cepat diekskresi melalui empedu dan mengalami sirkulasi enterohepatik. Absorpsinya dihambat dengan adanya makanan. Rifampisin didistribusikan ke seluruh tubuh dan kadar efektif dicapai dalam berbagai organ dan cairan tubuh, termasuk cairan otak. Luasnya distribusi rifampisin tercermin dengan warna merah jingga pada urin, tinja, sputum, air mata, dan keringat. Masa paruh eliminasi rifampisin bervariasi antara 1,5 sampai 5 jam dan memanjang pada pasien dengan gangguan fungsi hepar. Ekskresi melalui urin mencapai 30% dan dieliminasi juga melalui air susu ibu (ASI) (Istiantoro & Setiabudy, 2007).

Universitas Indonesia

Etambutol HCl memberikan kadar puncak dalam plasma setelah 2 sampai 4 jam setelah pemberian oral. Dosis tunggal 15 mg/kgBB sehari sekali memberikan kadar dalam plasma sekitar 5 µg/mL. Masa paruh eliminasinya 3-4 jam dan 50% etambutol diekskresikan dalam bentuk asal melalui urin serta 10% sebagai metabolit. Etambutol tidak dapat menembus sawar darah otak (Istiantoro & Setiabudy, 2007).

2.1.4 Tablet 4FDC

Penggunaan tablet 4FDC ini termasuk salah satu dari konsep DOTS dari rekomendasi WHO. DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course*) merupakan salah satu upaya dalam mengatasi masalah resistensi (Chuluq, 2004). Saat ini, gabungan isoniazid dan pirazinamid terdapat dalam bentuk tablet TB1 FDC 4[®] (Kimia Farma) dan kaplet Rimstar 4FDC[®] (Sandoz) bersama-sama dengan rifampisin dan etambutol HCl (ISFI, 2007).

2.2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi telah banyak digunakan secara luas sebagai teknik pemisahan dan analisis (Hadjar, M.M.I., 1985). Saat ini KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel dalam sejumlah bidang. KCKT merupakan metode yang dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas:

a. Pompa

Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan.

b. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan memasukkan sampel ke kolom.

c. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar. Untuk suatu puncak yang simetris,

faktor ikutan (T_f) besarnya satu, dan besarnya harga T_f ini akan bertambah jika kromatogram makin tampak berekor.

d. Detektor KCKT

Keunggulan KCKT juga adalah luasnya pilihan detektor yang dapat digunakan. Terdapat detektor ultraviolet/visibel, detektor fluoresensi, fotometer inframerah, dan detektor indeks bias. (Hadjar, M.M.I.,1985). Namun yang paling banyak digunakan dalam KCKT adalah detektor UV (Gandjar & Rohman, 2007).

e. Komputer, integrator, rekorder

Ketiganya adalah alat pengumpul data dan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram.

KCKT dapat dibagi menjadi beberapa jenis yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, dan kromatografi eksklusi ukuran (Swarbrick dan Boylan, 1988). Pada penelitian ini akan digunakan kromatografi partisi atau yang disebut juga kromatografi fase terikat (Gandjar & Rohman, 2007).

Kromatografi partisi fase terbalik adalah kromatografi yang paling populer digunakan saat ini. Jenis kolom (fase diam) pada fase balik antara lain $-C_{18}$, $-C_8$, $-CN$, $-fenil$; sedangkan jenis eluennya antara lain metanol, air, asetonitril. Pada fase terbalik, fase gerak relatif lebih polar daripada fase diam, sehingga urutan elusinya adalah polar dielusi lebih awal dan non polar dielusi terakhir (Gandjar & Rohman, 2007).

2.3 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Harmita, 2006). Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode (*ruggedness*) dan kekuatan (*robustness*) (Harmita, 2006). Validasi analisis yang dilakukan dalam matriks biologis disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini bisa digunakan pada studi farmakologi klinis, pengujian

bioavailabilitas (BA) dan bioekivalensi (BE), serta uji farmakokinetika (PK) (Harahap, 2010).

Validasi metode bioanalisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode tertentu yang digunakan untuk pengukuran analit secara kuantitatif di dalam matriks biologis, seperti darah, plasma, serum, atau urin, dapat dipercaya dan reproduksibel sesuai tujuan penggunaannya (FDA, 2001).

Validasi metode dapat dibagi menjadi 3, yaitu:

1. Validasi Total (*Full Validation*)

Validasi total penting dilakukan saat melaksanakan dan mengembangkan metode bioanalisis untuk pertama kalinya atau untuk senyawa obat baru.

2. Validasi Parsial (*Partial Validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi terhadap metode bioanalisis yang telah valid. Validasi parsial dapat dilakukan mulai dari hal yang sederhana seperti akurasi dan presisi sampai dilakukan mendekati validasi total.

3. Validasi Silang (*Cross Validation*)

Validasi silang merupakan perbandingan terhadap parameter validasi ketika 2 atau lebih metode bioanalisis digunakan. Contoh dari validasi ini dapat digambarkan sebagai situasi dimana metode bioanalisis yang telah valid dianggap sebagai referensi dan metode bioanalisis hasil revisi sebagai pembandingnya.

Pengukuran terhadap setiap analit dalam matriks biologis harus mengalami proses validasi terlebih dahulu. Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduksibilitas, dan stabilitas (FDA, 2001).

2.3.1 Selektivitas

Selektivitas adalah ukuran kemampuan suatu metode analisis untuk memisahkan dan menganalisis kuantitatif analit dengan adanya komponen lain di dalam sampel. Untuk selektivitas, analisis terhadap matriks biologis harus dilakukan terhadap paling sedikit 6 blanko yang berbeda sumber (FDA, 2001).

Setiap sample blanko harus diuji terhadap interferensinya, dan selektivitas harus dilakukan juga pada kadar *Lower Limit of Quantification* (LLOQ). Jika suatu metode digunakan untuk menganalisis kuantitatif lebih dari satu analit,

Universitas Indonesia

setiap analit harus diuji interferensinya untuk memastikan bahwa tidak terdapat senyawa yang dapat mengganggu analisis (FDA, 2001).

2.3.2 Akurasi, Presisi dan Rekoveri

Akurasi menggambarkan kedekatan suatu hasil analisis dari metode yang digunakan dengan hasil sebenarnya. Akurasi dapat ditentukan dari pengulangan hasil analisis terhadap sampel yang diketahui kadarnya. Untuk analisis dalam matriks biologis, akurasi harus diukur pada minimum 5 kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Perbedaan nilai yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20% (FDA, 2001).

Presisi suatu metode analisis merupakan kedekatan hasil analisis antar setiap pengukuran individu ketika suatu metode analisis diulang. Untuk analisis dalam matriks biologis, presisi harus diukur pada minimum 5 kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Koefisien variasi yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20%.

Nilai perolehan kembali (% *recovery*) merupakan rasio respon detektor yang diperoleh dari jumlah analit yang diekstraksi dari matriks biologis, dibandingkan dengan respon detektor dari baku dalam yang diketahui konsentrasinya. Rekoveri adalah efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis. Untuk analisis dalam matriks biologis, nilai rekoveri tidak harus 100%, tetapi diusahakan konsisten, presisi, dan reproduksibel. Pengujian harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada 3 konsentrasi (rendah, sedang, dan tinggi) yang diekstraksi dari matriks biologis dengan baku tidak terekstraksi yang mewakili 100% rekoveri (FDA, 2001).

2.3.3 Kurva Kalibrasi / Kurva Standar

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi didapat dengan menyuntik seri

Universitas Indonesia

konsentrasi standar kemudian dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan respon detektor. Untuk membuat kurva kalibrasi dalam analisis matriks biologis, gunakan matriks biologis yang sama dengan matriks biologis yang akan digunakan untuk sampel, dengan cara memasukkan standar yang telah diketahui konsentrasinya ke dalam matriks (FDA, 2001).

Rentang konsentrasi standar dibuat berdasarkan perkiraan konsentrasi sampel yang akan dianalisis. Pembuatan kurva kalibrasi harus mencakup 1 sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), 1 *zero sample* (matriks dengan baku dalam), dan 6 sampai 8 *non-zero samples* pada rentang konsentrasi standar, termasuk LLOQ (FDA, 2001).

a. *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Konsentrasi standar terendah dari kurva kalibrasi dapat diterima sebagai batas terendah kuantifikasi jika respon analit pada LLOQ harus setidaknya 5 kali respon yang dihasilkan dari blank sampel (matriks tanpa baku dalam) serta respon analit harus dapat diidentifikasi, terpisah dengan baik, dan reproduibel dengan nilai presisi 20% dan akurasi 80-120%.

b. Kurva Kalibrasi/Kurva Standar/Konsentrasi-Respon

Syarat kurva kalibrasi yang harus dipenuhi yaitu memiliki nilai deviasi sebesar 20% dari konsentrasi nominal pada LLOQ dan nilai deviasi sebesar 15% dari konsentrasi nominal pada standar selain LLOQ. Paling sedikit 4 dari 6 *non-zero standards* harus memenuhi syarat di atas, termasuk LLOQ dan konsentrasi tertinggi dari kalibrasi standar (FDA, 2001).

2.3.4 Stabilitas

Stabilitas obat di dalam cairan biologis merupakan fungsi dari kondisi penyimpanan, sifat-sifat kimia obat, matriks, dan wadah yang digunakan. Stabilitas analit di dalam matriks dan wadah yang digunakan hanya relevan pada matriks dan wadah tersebut dan tidak dapat diekstrapolasikan ke matriks dan wadah lain. Prosedur stabilitas mengevaluasi stabilitas analit selama pengumpulan dan penanganan sampel, penyimpanan jangka panjang (dengan pembekuan matriks) dan jangka pendek (pada temperatur kamar), dan setelah melewati siklus beku dan cair dan proses analisis (FDA, 2001).

2.3.4.1 Stabilitas Beku dan Cair (*Freeze and Thaw*)

Stabilitas analit dapat ditentukan setelah 3 siklus beku dan cair. Paling tidak masing-masing 3 aliquot dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi disimpan pada kondisi beku selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan dibiarkan sampai mencair pada suhu kamar. Setelah mencair sempurna, sampel dibekukan kembali selama 12 atau 24 jam pada kondisi yang sama. Siklus beku dan cair harus diulang sebanyak 2 kali, kemudian dianalisis pada siklus ketiga. Jika analit memang tidak stabil pada suhu kamar, maka untuk menguji stabilitas dapat dilakukan pembekuan pada -70°C selama siklus beku dan cair (FDA, 2001).

2.3.4.2 Stabilitas Temperatur Jangka Pendek

Masing-masing 3 aliquot dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi dibiarkan pada suhu kamar selama 4-24 jam (ditentukan berdasarkan perkiraan waktu yang dibutuhkan untuk mengelola sampel) kemudian dianalisis (FDA, 2001).

2.3.4.3 Stabilitas Jangka Panjang

Lamanya penyimpanan untuk uji stabilitas jangka panjang harus melebihi durasi waktu pengumpulan sampel pertama sampai analisis sampel terakhir (FDA, 2001).

2.3.4.4 Stabilitas Larutan Stok

Stabilitas dari larutan stok zat aktif dan baku dalam harus dievaluasi pada suhu kamar selama paling sedikit 6 jam. Setelah itu, dilakukan perbandingan respon detektor larutan tersebut dengan respon detektor larutan yang baru dibuat (FDA, 2001).

2.3.4.5 *Post-Preparative Stability*

Stabilitas dari sampel yang telah diproses, termasuk waktu sampel berada dalam autosampler (FDA, 2001).

2.4 Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid

Berikut ini adalah beberapa metode yang sebelumnya telah dilakukan:

2.4.1 *High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Isoniazid and Acetylisoniazid in Human Plasma* (Holdiness, M.R., 1982)

Preparasi sampel:

Campur 2 mL plasma + 100 μ L 30 μ g/mL internal standar dalam air, tambah 2 g amonium sulfat, tambah 40 mL air yang jenuh dengan n-butanol:chloroform 30:70, kocok selama 10 menit, sentrifugasi 500 g selama 10 menit. Pindahkan lapisan organik ke dalam tabung, tambah 1 mL IM asam sulfat, kocok selama 10 menit, sentrifugasi 500 g selama 10 menit, suntikkan 250 μ L aliquot dari lapisan atas larutan.

Kondisi analisis :

Guard column: 10 μ m μ Bondapak C₁₈

Kolom : 115x8,5 μ m μ Bondapak C₁₈ *radial compession*

Fase gerak : EtOH:1mM dioctyl sulfosuccinate 45:55, atur pH 2,5

Kecepatan alir : 4 mL/menit

Volume injeksi : 250 μ L

Detektor : UV 254 nm

Waktu retensi : isoniazid 10,7 menit

2.4.2 Pengembangan dan Validasi dengan Metode Gradien LC untuk Penetapan Kadar Isoniazid dan Asetilisonizid pada Plasma Manusia (Mahjub & Khalili, H. & Amini, M., 2009)

Preparasi sampel:

Plasma dikumpulkan dan disimpan pada suhu -20°C sebelum analisis. 1 mL plasma ditambahkan 25 μ L isoniazid dengan konsentrasi 50 μ g/mL dan 250 μ L 0,5 M dapar fosfat pH 7,4 dan 50 μ L NaCl. Ekstraksi dilakukan dengan 5 mL pelarut organik kloroform dan 1-butanol (70:30, v/v) kemudian sentrifugasi 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Sebanyak 50 μ L aliquot dari supernatan di injeksikan ke sistem LC.

Kondisi analisis:

Menggunakan kolom C₁₈ fase terbalik 15x 0,46 cm, 5 µm (Tracer Excel, Barcelona) dan detektor UV-Vis (K-2600) pada 266 nm dengan metode gradien dan kecepatan alir 1,5 mL/menit dengan fase gerak Pelarut A yaitu dapar fosfat (0,01 M, pH 7,9) dan Pelarut B yaitu air yang dibuat menjadi pH 3 menggunakan 17% larutan asam fosfat dan Pelarut C yaitu metanol.

Waktu (menit)	Pelarut A	Pelarut B	Pelarut C	Mode
0	100	0	0	Ekuilibrasi
0:00 - 5:00	100	0	0	Isokratik
5:00 - 5:30	100 → 0	0 → 100	0	Gradien linier
5:30 - 20:00	0	100 → 90	0 → 10	Gradien linier
20:00 - 25:00	0	90 → 70	10 → 30	Gradien linier

[Sumber: J. Chromatogr no 71, March 2010]

Tabel 2.1. Program Gradien

Pada kondisi analisis ini, waktu retensi untuk asetilisoniazid (Ac-INH) dan INH masing-masing adalah 5,08 dan 6,2 menit.

2.4.3 *Development and Validation of an Assay for Isoniazid and Acetylisoniazid in Rat Plasma and Alveolar Macrophages* (Zhou, H. & Zhang, D & Claffey, D. & Hybertson, B., 2004)

Preparasi sampel:

100 µL sampel diekstraksi dengan 400 µL asetonitril dan disentrifugasi. Supernatan dialirkan nitrogen kering dan direkonstitusi dengan air dan disuntikkan.

Kondisi analisis:

Menggunakan HPLC/MS/MS

Detektor: *Applied Biosystems API-4000 mass spectrometer* (Sciex)

Fase gerak: Gradien dengan pelarut A adalah 0,1% asam format dalam air dan pelarut B adalah metanol. Selama 6 menit pertama digunakan 92% A, 6-9 menit digunakan 92% A menjadi 2% A. 9-16 menit digunakan 2% A.

2.4.4 *Therapeutic Monitoring of Isoniazid, Pyrazinamide and Rifampicin in Tuberculosis Patients Using LC* (Unsalan, S, dkk, 2005)

Preparasi sampel:

Untuk PZA dan RIF, 100 μ L plasma dan dengan 200 μ L larutan asetanilid 6,25 mg/L dalam asetonitril dicampur dengan vortex dan disentrifugasi. Supernatan sebanyak 150 μ L dievaporasikan. Residu direkonstitusi dengan 30 μ L air dan disuntikkan ke kolom.

Untuk INH, 100 μ L plasma dicampur dengan 50 μ L 10% TCA yang mengandung 25 mg/L asetanilid dalam asetonitril, kemudian disentrifugasi. 50 μ L supernatan dinetralkan dengan amonium asetat 0,5 M pH 8,4 dan disuntikkan ke kolom.

Kondisi analisis:

Kolom: Nova-Pak C₁₈ (Waters) 4 μ m, 3,9x150 mm

Detektor : *Diode array*

Fase gerak : Gradien dengan pelarut A adalah 10 mmol kalium dihidrogen fosfat pH 6,24 dan pelarut B adalah asetonitril. 1 menit pertama menggunakan 3% Pelarut B yang kemudian dinaikkan menjadi 40% Pelarut B pada menit ke-5,5. Pada menit ke 12, diturunkan menjadi 3% Pelarut B.

Kecepatan alir: 0,8 mL/menit

Volume suntikkan : 20 μ L

Baku dalam : Asetanilid

Waktu retensi : isoniazid 3,8 menit; pirazinamid 4,6 menit; rifampisin 10,2 menit, asetanilid 8,1 menit

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif dan laboratorium-laboratorium penunjang lainnya di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari 2011 sampai dengan Mei 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu) terdiri dari pompa (LC-6 A), injektor manual, kolom C₁₈ (Shimpack[®] 5 µm; 250 x 4,6 mm), detektor UV (SPD-6A), dan pengolah data pada komputer CBM-102); spektrofotometer UV-Vis (Jasco); *syringe* (Hamilton); pH meter (Eutech pH 510); timbangan analitik (Shimadzu); penyaring eluen (Whatman); penghilang gas (Elmasonic S60H); sentrifugator (Spectrafuge); vortex (Maxi Max); mikropipet (Socorex); mikrotube; alat-alat gelas

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan Baku

Isoniazid (Second Pharma Co. Ltd); pirazinamid (Calyx Chemical & Pharmaceutical Ltd); rifampisin (Hebei Xingang Pharmaceutical); etambutol HCl (Lupin Limited); asam nikotinat (Sigma Aldrich); aqua bidestillata (Ika Pharmindo); asetonitril (Gradien grade for HPLC, Merck); kalium dihidrogen fosfat (For analysis, Merck); trietilamin (For synthesis, Merck); plasma darah (PMI); 2 sampel tablet 4FDC ;metanol (Gradien grade for HPLC; Merck)

3.2.2.2 Fase gerak untuk KCKT

a. Fase gerak larutan kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1)

Campurkan 990 ml larutan KH₂PO₄ 10 mmol pH 6,2 yang diatur dengan trietilamin (TEA) dengan 10 ml asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak disaring melalui membran 0,45 µm dan dilakukan proses penghilangan gas.

b. Fase gerak larutan kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3)

Campurkan 970 ml larutan KH_2PO_4 10 mmol pH 6,2 yang diatur dengan trietilamin (TEA) dengan 30 ml asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak disaring melalui membran 0,45 μm dan dilakukan proses penghilangan gas.

3.2.2.2 Larutan induk

a. Larutan induk isoniazid dan pirazinamid

Senyawa baku isoniazid dan pirazinamid masing-masing ditimbang dengan seksama sebanyak 7,58 mg dan 40,95 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Larutkan dengan air, kemudian tambahkan sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan yang mengandung isoniazid dan pirazinamid dengan konsentrasi 3,03 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,63 $\mu\text{g/mL}$.

b. Larutan induk baku dalam

Senyawa baku asam nikotinat ditimbang dengan seksama sebanyak 25,80 mg kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Larutkan zat dengan air kemudian tambahkan sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 10,32 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Dibuat larutan induk isoniazid, pirazinamid, dan asam nikotinat diencerkan dengan air hingga diperoleh konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut dibuat kurva serapannya dan dicatat nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis. Nilai panjang gelombang optimum dipilih untuk analisis.

3.3.2 Optimasi Kondisi Analisis

3.3.2.1 Pemilihan Metode Analisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid

Larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dengan konsentrasi 3,03 $\mu\text{g/mL}$ dan 16,38 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan

fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) sebagai kondisi awal. Selanjutnya disuntikkan 20,0 mL larutan ke alat KCKT dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) sebagai kondisi awal.

Untuk pemilihan metode, laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Dicatat waktu retensi, nilai N, HETP, faktor ikutan dan perbandingan area isoniazid dan pirazinamid yang diperoleh. Bandingkan hasil analisis yang diperoleh dari fase gerak yang pertama dan kedua.

3.3.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam

Larutan standar asam nikotinat dibuat dengan konsentrasi 10,32 $\mu\text{g/mL}$ kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Waktu retensi dari asam nikotinat dicatat.

Kemudian dibuat larutan campuran isoniazid, pirazinamid, dan larutan asam nikotinat sebagai baku dalam dengan konsentrasi masing-masing 3,03 $\mu\text{g/mL}$, 16,38 $\mu\text{g/mL}$, dan 10,32 $\mu\text{g/mL}$. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih dengan laju alir 1,0 mL/menit. Diperoleh waktu retensi isoniazid, pirazinamid, dan asam nikotinat. Dihitung nilai resolusi (R).

3.3.2.3 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis

Larutan yang mengandung isoniazid dengan konsentrasi 3,03 $\mu\text{g/mL}$ dan pirazinamid dengan konsentrasi 16,38 $\mu\text{g/mL}$, dan asam nikotinat dengan konsentrasi 10,32 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Dicatat dan dibandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, resolusi (R), dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh.

3.3.2.4 Pengaruh rifampisin dan etambutol HCl terhadap analisis

Larutan campuran isoniazid, pirazinamid, rifampisin, dan etambutol HCl dengan konsentrasi masing-masing 3,03 $\mu\text{g/mL}$, 16,38 $\mu\text{g/mL}$, 6,00 $\mu\text{g/mL}$, 5,52 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak

kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) dan laju alir 1,0 mL/menit. Kemudian diamati apakah ada gangguan yang mengganggu terhadap isoniazid dan pirazinamid.

3.3.3 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran yang mengandung isoniazid dengan konsentrasi 3,03 µg/ml dan pirazinamid dengan konsentrasi konsentrasi 16,38 µg/ml ditambahkan asam nikotinat sebagai baku dalam konsentrasi 10,32 µg/mL. Disuntikkan larutan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Catat waktu retensi, hitung nilai N, HETP, faktor ikutan yang diperoleh, serta presisi pada enam kali penyuntikkan.

3.3.4 Validasi Metode Analisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Tablet

3.3.4.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar, Penentuan Koefisien Regresi (r) serta Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Sebanyak 38,0 mg standar isoniazid dan 198,0 mg pirazinamid ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Zat dilarutkan dengan air dan dicukupkan volumenya hingga batas. Kemudian larutan di atas diencerkan dengan fase gerak hingga didapatkan seri konsentrasi 0,9132; 1,2176; 1,522; 1,8264; 2,1308; 2,4352 µg/mL. Masing-masing larutan dengan seri konsentrasi tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT sebanyak dua kali dan dihitung nilai rata-ratanya.

Kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi larutan standar campuran isonizid dan pirazinamid dengan area kromatogram. Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan untuk mendapatkan persamaan garis regresi, koefisien regresi (r), serta limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ).

3.3.4.2 Uji Selektivitas (Spesifisitas)

Uji selektivitas dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan yang mengandung eksipien plasebo tablet untuk melihat kemungkinan gangguan dari eksipien tablet pada daerah waktu retensi setiap zat aktif. Hasil kromatogram

larutan hasil uji selektivitas tidak boleh mengandung gangguan di sekitar waktu retensi zat aktif, baik isoniazid maupun pirazinamid.

3.3.4.3 Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan pada kadar isoniazid dan pirazinamid sebesar 80%, 100%, dan 120%. Dibuat formulasi plasebo tablet, kemudian ditimbang sejumlah standar isoniazid dan pirazinamid hingga diperoleh kadar 80%, 100%, dan 120% dari yang tertera pada label sediaan jadi. Lakukan pengenceran hingga konsentrasi tertentu dengan fase gerak. Larutan disuntikkan sebanyak tiga kali masing-masing 20,0 μ l ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dihitung nilai % perolehan kembali (% recovery) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.4.4 Uji Presisi

Presisi dilakukan dengan dibuat formulasi plasebo tablet dengan konsentrasi zat aktif sebesar 100% sebanyak enam kali penimbangan. Dihitung % perolehan kembali (% recovery) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.4.5 Stressed Test

Untuk menguji pada kondisi stres, dibuat larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dengan konsentrasi 3,03 μ g/mL dan 16,38 μ g/mL di dalam 2 kondisi, yaitu dalam HCl 0,1 N dan dalam NaOH 0,1 N. Larutan tersebut disimpan selama 24 jam, kemudian disuntikkan ke KCKT pada kondisi analisis terpilih. Setelah itu, diamati bentuk masing-masing zat pada kromatogram hasil pengaruh dari lingkungan asam maupun basa.

3.3.5 Pengukuran Kadar Isoniazid dan Pirazinamid dalam Sampel Tablet

Pengukuran kadar isoniazid dan pirazinamid dilakukan terhadap 2 sampel tablet FDC4 dengan merek dagang berbeda. Digerus sebanyak 20 sampel tablet kemudian dihitung bobot rata-ratanya. Sampel tersebut kemudian dihaluskan dan ditimbang sejumlah bobot tertentu. Sampel dimasukkan ke labu ukur 50,0 mL, dilarutkan dalam air dengan cara disonikasi selama 30 menit dan dicukupkan volumenya dengan air. Larutan dimasukkan ke tabung sentrifus dan disentrifugasi

selama 15 menit kemudian diambil larutan yang jernih dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak hingga diperoleh konsentrasi tertentu. Larutan disuntikkan sebanyak 3 kali ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Hitung kadar isoniazid dan pirazinamid yang terdapat dalam masing-masing sampel tablet.

3.3.6 Penyiapan Sampel Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Plasma

Pada labu ukur 2,0 mL ditambahkan larutan standar isoniazid dan larutan standar pirazinamid dan larutan asam nikotinat sebagai baku dalam hingga konsentrasi tertentu. Selanjutnya dipipet 300 μL dari larutan tadi dan ditambahkan 300 μL asetonitril, dikocok dengan vortex selama 1 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dipipet 200 μL kemudian diuapkan dengan evaporator pada suhu 60°C dan selanjutnya direkonstitusi dengan 100 μL fase gerak dan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih.

3.3.7 Validasi Metode Bioanalisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Plasma *In Vitro*

3.3.7.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma

Pada 300 μL plasma dilakukan deproteinasi dengan ditambahkan 300 $\mu\text{g/mL}$ asetonitril, didikocok dengan vortex selama 1 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 200 μL dan dimasukkan ke tabung reaksi kemudian dilakukan penguapan pada suhu 60°C . Hasil penguapan direkonstitusi dengan fase gerak sebanyak 100 μL dan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diamati puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu.

3.3.7.2 Pengukuran Limit Kuantitasi (LOQ) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi bertingkat dengan penambahan baku dalam terpilih, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel.. Kurva kalibrasi untuk isoniazid

disiapkan pada konsentrasi 4,74; 6,32; 7,90; 9,48; 11,06; 12,64; 23,70 $\mu\text{g/mL}$ dan untuk pirazinamid disiapkan dengan konsentrasi 16,00; 32,00; 40,00; 48,00; 56,00; 64,00; 120,00 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ.

Setelah diperoleh nilai LOQ, maka disiapkan larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dengan konsentrasi yang diturunkan dari nilai LOQ dan diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Larutan hasil rekonstitusi disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak lima kali. Persentase akurasi (*% diff*) dan koefisien variasinya (KV) dihitung. Deviasi nilai yang diperoleh dari LLOQ dengan nilai sebenarnya tidak boleh menyimpang lebih dari +20% dan -20%.

3.3.7.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Sampel plasma yang mengandung isoniazid dan piazinamid pada konsentrasi LLOQ dengan penambahan asam nikotinat sebagai baku dalam disiapkan, setelah itu diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih dan diamati apakah pada waktu retensi yang sama dengan isoniazid, pirazinamid, dan baku dalam terdapat kromatogram (interferensi) dari ekstrak plasma. Dihitung nilai *% diff* dan KV-nya. Pengujian dilakukan terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

3.3.7.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), *zero sample* (plasma dengan baku dalam), serta 7 *non-zero sample* (plasma dengan analit termasuk LLOQ) dengan konsentrasi 4,74; 6,32; 7,90; 9,48; 11,06; 12,64; 23,70 $\mu\text{g/mL}$ untuk isoniazid dan konsentrasi 16,00; 32,00; 40,00; 48,00; 56,00; 64,00; 120,00 $\mu\text{g/mL}$ disiapkan dengan penambahan baku dalam. Lakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Setelah itu regresi perbandingan area (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dari masing-masing

konsentrasi dianalisis dan disiapkan kurva kalibrasinya. Koefisien korelasi dari persamaan garis regresi linier dihitung untuk melihat linearitas kurva tersebut.

3.3.7.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dengan konsentrasi rendah (14,00 dan 73,32 $\mu\text{g/mL}$), sedang (16,00 dan 94,27 $\mu\text{g/mL}$), dan tinggi (20,00 dan 104,75 $\mu\text{g/mL}$) disiapkan dengan penambahan asam nikotinat sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Ulangi prosedur di atas sebanyak 5 kali kemudian dihitung selisih nilai terukur dengan nilai sebenarnya dibandingkan dengan nilai sebenarnya (% *diff*) dan nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama 5 hari (akurasi dan presisi intra hari).

3.3.7.6 Uji Perolehan Kembali (% *Recovery*)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan cara menyiapkan plasma yang mengandung isoniazid dan pirazinamid pada konsentrasi rendah (14,00 dan 73,32 $\mu\text{g/mL}$), sedang (16,00 dan 94,27 $\mu\text{g/mL}$), dan tinggi (20,00 dan 104,75 $\mu\text{g/mL}$) dan ditambahkan asam nikotinat sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel.

Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Ulangi prosedur di atas sebanyak 5 kali. Nilai perolehan kembali (% *recovery*) dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi obat dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi obat yang sebenarnya.

3.3.7.7 Uji Stabilitas

a. Stabilitas Beku dan Cair (*freeze and thaw stability*)

Larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dengan konsentrasi rendah (14,00 dan 73,32 $\mu\text{g/mL}$) dan tinggi (20,00 dan 104,75 $\mu\text{g/mL}$)

disiapkan, kemudian dilakukan tiga siklus beku dan cair. Setelah itu ditambahkan larutan asam nikotinat sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Tiga aliquot disuntikkan untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

b. Stabilitas Temperatur Jangka Pendek

Larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 4-24 jam. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Tiga aliquot disuntikkan untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

c. Stabilitas Jangka Panjang

Larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dengan konsentrasi rendah (14,00 dan 73,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dan tinggi (20,00 dan 104,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disiapkan, kemudian disimpan pada *freezer* dengan suhu -20°C . Pada hari ke-0, 3, dan 7 larutan diambil, ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Tiga aliquot disuntikkan untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

d. Stabilitas Larutan Stok

Larutan campuran disiapkan dengan konsentrasi isoniazid 3,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan pirazinamid 16,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ditambah larutan asam nikotinat sebagai baku dalam dengan konsentrasi 10,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Larutan tersebut disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam kemudian disuntikkan 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan membandingkan respons

instrumen terhadap larutan stok yang telah disimpan dengan larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan. Sebagian larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 3, 7, 10, 14, dan 17 hari sebelum dilakukan analisis.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis

Pada penelitian ini, pemilihan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setiap zat aktif dan baku dalam dibuat spektrum serapannya pada konsentrasi 10 µg/mL, di-*overlay*, kemudian ditentukan panjang gelombang optimumnya. Panjang gelombang optimum terpilih adalah 242 nm. Panjang gelombang tersebut dipilih karena isoniazid memberikan serapan yang relatif besar. Pentingnya memilih panjang gelombang dimana serapan isoniazid paling besar dikarenakan saat analisis kuantitatif akan digunakan konsentrasi isoniazid yang lebih kecil daripada pirazinamid (1:5,3). Selain itu, diharapkan pula sensitivitas detektor terhadap isoniazid akan menjadi lebih besar sehingga memungkinkan untuk menganalisis isoniazid, terutama dalam matriks biologis, dengan konsentrasi yang minimum. Spektrum serapan gabungan zat isoniazid, pirazinamid, dan asam nikotinat pada spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 4.2.

4.2 Optimasi Metode Analisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid

4.2.1 Pemilihan Metode Analisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid

Sebelum melakukan optimasi metode analisis, terlebih dahulu diadakan pemilihan metode analisis terbaik untuk analisis campuran isoniazid dan pirazinamid. Metode yang pertama terdiri dari fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) dan metode yang kedua terdiri dari fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit.

Untuk mengetahui zat yang memiliki waktu retensi lebih singkat, setiap zat disuntikkan terlebih dahulu pada metode analisis yang pertama sebagai kondisi analisis sementara. Berdasarkan pengamatan, isoniazid memiliki waktu retensi yang lebih singkat daripada pirazinamid.

Metode yang dipilih adalah metode pertama dengan fase gerak dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) untuk analisis dalam tablet dan fase gerak dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) untuk analisis dalam plasma. Kedua

fase gerak memberikan pemisahan yang baik dalam tablet, namun pada analisis di plasma manusia dengan fase gerak dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) terdapat gangguan di waktu retensi pirazinamid sehingga digunakan fase gerak dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1). Analisis dalam tablet tidak menggunakan fase gerak dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) sebab waktu analisis yang lebih panjang yaitu 23 menit. Oleh sebab itu, untuk analisis dalam tablet menggunakan fase gerak dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3).

4.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam

Baku dalam digunakan untuk mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi selama proses analisis, seperti kesalahan volume injeksi maupun kesalahan pada proses ekstraksi. Pada proses validasi metode bioanalisis, area yang terdeteksi akan lebih kecil daripada area standar yang digunakan untuk mengukur konsentrasi obat dalam tablet seiring dengan konsentrasinya dalam darah. Penyimpangan kecil selama proses analisis dapat berdampak besar bagi kesalahan hasil analisis, sehingga penambahan baku dalam dapat mengurangi penyimpangan-penyimpangan tersebut.

Pada penelitian ini, baku dalam yang digunakan adalah asam nikotinat. Disuntikkan larutan standar asam nikotinat sebanyak 20,0 μL . Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam nikotinat dapat digunakan sebagai baku dalam karena memiliki daya pisah yang baik terhadap isoniazid maupun pirazinamid.

4.2.3 Optimasi Metode Analisis Terpilih

Optimasi metode analisis dilakukan dengan mengubah laju alir sistem kromatografi. Laju alir yang digunakan semula adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Data statistik dari optimasi metode analisis ini dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Tabel 4.5. Laju alir yang terpilih adalah 1,0 mL/menit karena dianggap memberikan nilai N , HETP, T_f dan pemisahan yang baik.

4.2.4 Pengaruh rifampisin dan etambutol HCl terhadap analisis

Pada tablet kombinasi tetap terdiri dari isoniazid, pirazinamid, rifampisin, dan etambutol HCl maka itu dilihat pengaruh adanya rifampisin dan etambutol HCl terhadap kromatogram isoniazid dan pirazinamid. Dari hasil percobaan, baik etambutol HCl dan rifampisin tidak mempengaruhi kromatogram. Hal ini diperkirakan sebab etambutol HCl tidak memiliki gugus kromofor dan rifampisin yang cenderung non polar tidak terelusi dengan fase gerak terpilih. Gambar dapat dilihat di Gambar 4.9.

4.3 Uji Kesesuaian Sistem

Sebelum dilakukan validasi metode analisis, terlebih dahulu dilakukan uji kesesuaian sistem untuk memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung (FDA, 1994). Pada metode terpilih, dilakukan uji kesesuaian sistem sebanyak 6 kali penyuntikan larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dan baku dalam. Konsentrasi larutan isoniazid, pirazinamid, dan asam nikotinat berturut-turut sebesar 3,03 µg/mL, 16,38 µg/mL, dan 10,32 µg/mL. Dari hasil penyuntikan, diperoleh waktu retensi dan area masing-masing zat kemudian dihitung perbandingan area setiap zat aktif dengan baku dalam.

Waktu retensi setiap zat mulai dari isoniazid, pirazinamid, dan asam nikotinat berturut-turut adalah 7,4 menit, 10,0 menit dan 5,5 menit untuk fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3). Koefisien variasi yang didapat dari uji kesesuaian sistem untuk isoniazid dan pirazinamid berturut-turut sebesar 1,68% dan 1,43%. Waktu retensi zat isoniazid, pirazinamid, dan asam nikotinat berturut-turut adalah 11,7 menit, 16,08 menit, dan 7,7 menit, dengan koefisien variasi untuk isoniazid dan pirazinamid sebesar 1,58% dan 1,70%. Hasil statistik uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Tabel 4.7.

4.4 Validasi Metode Analisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Tablet

4.4.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar, Penentuan Koefisien Regresi (r) serta Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ).

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Cara mendapatkan persamaan kurva kalibrasi dapat dilihat pada Lampiran 3, Rumus 4.5. Pada percobaan, diperoleh persamaan kurva kalibrasi $y = 26065,79x - 1170,86$ untuk isoniazid dan $y = 15939,48x - 4722,83$ untuk pirazinamid.

Koefisien regresi yang didapat adalah $r = 0,9992$ untuk isoniazid dan $r = 0,9992$ untuk pirazinamid. Nilai r untuk kedua zat memenuhi standar linearitas yang ditetapkan yaitu lebih besar sama dengan $0,999$ (FDA, 1994). Dari persamaan kurva kalibrasi ini dihitung pula limit deteksi dan limit kuantitasi untuk setiap zat dengan Rumus 4.6 dan 4.7. Limit deteksi untuk isoniazid adalah $0,07 \mu\text{g/mL}$ dan untuk pirazinamid $0,08 \mu\text{g/mL}$. Limit kuantitasi untuk isoniazid adalah $0,24 \mu\text{g/mL}$ dan untuk pirazinamid $0,28 \mu\text{g/mL}$. Hasil statistik untuk kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.8.

4.4.2 Uji Selektivitas

Selektivitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2006). Dalam suatu sediaan tablet komponen lain yang mungkin terdapat dalam sampel adalah eksipien-eksipien tablet. Oleh sebab itu, untuk menguji selektivitas disuntikkan larutan yang mengandung eksipien plasebo tablet yang telah diekstraksi sebelumnya menggunakan air kemudian diencerkan dengan fase gerak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini selektif karena tidak terdapat gangguan dari eksipien plasebo tablet pada waktu retensi zat aktif, baik isoniazid, pirazinamid maupun asam nikotinat. Hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Gambar 4.12.

4.4.3 Uji Akurasi

Akurasi merupakan ukuran kedekatan hasil percobaan terhadap nilai sebenarnya (FDA, 1994). Uji akurasi pada penelitian ini menggunakan metode *spiked placebo recovery* dengan cara menambahkan sejumlah tertentu zat aktif ke dalam formulasi plasebo.

Bobot akhir yang ditimbang lebih kurang 1120 mg yang terdiri dari serbuk plasebo tablet dan standar isoniazid dan pirazinamid pada kadar 80%, 100%, dan 120% dari kadar yang tertera pada label. Kadar yang tertera pada label sebesar 75 mg isoniazid dan 400 mg pirazinamid. Serbuk plasebo dan standar yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL; ditambahkan sejumlah volume air, disonikasi selama 30 menit, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dengan air. Larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi selama 15 menit dan diambil larutan yang jernih dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak sampai konsentrasi tertentu. Disuntikkan larutan sebanyak tiga kali masing-masing 20,0 μ L ke alat KCKT.

Metode yang digunakan memenuhi persyaratan akurasi yaitu nilai persen perolehan kembali 98 - 102 % dan menunjukkan presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi tidak melebihi 2 % (Harmita, 2006). Cara perhitungan untuk akurasi dan presisi dapat dilihat pada Rumus 4.8 dan Rumus 4.9. Data statistik uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.9.

4.4.4 Uji Presisi

Presisi merupakan ukuran kedekatan antara satu nilai terukur dengan nilai terukur lainnya pada kondisi analisis yang sama (FDA, 1994). Uji presisi dilakukan dengan cara melakukan 6 kali penimbangan terhadap formulasi tablet 4FDC. Awalnya, dilakukan penimbangan terhadap isoniazid, pirazinamid, rifampisin, etambutol HCl, dan eksipien tablet. Masing-masing ditimbang sesuai dengan bobot masing-masing pada tablet kombinasi tetap kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, ditambahkan sejumlah volume air, disonikasi selama 30 menit dan dicukupkan volumenya hingga batas dengan air. Larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi selama 15 menit dan diambil larutan yang jernih dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak sampai

konsentrasi tertentu dan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2006). Metode yang digunakan memenuhi kriteria presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi (KV) untuk isoniazid dan pirazinamid berturut-turut sebesar 1,46 % dan 0,92%. Hasil statistik uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.10.

4.4.5 Uji Stres

Pada penelitian ini, uji stres dilakukan terhadap 2 kondisi yaitu kondisi asam dan kondisi basa. Larutan isoniazid yang dengan konsentrasi 303,2 µg/mL dan larutan pirazinamid 1638 µg/mL diencerkan 100 kali dalam 2 pelarut, masing-masing HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N. Larutan tersebut disimpan selama 24 jam pada suhu kamar kemudian disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isoniazid dan pirazinamid tidak stabil terhadap suasana asam maupun basa. Pada suasana asam, terdapat kromatogram yang waktu retensinya berubah. Pada suasana basa juga terdapat kromatogram yang waktu retensi masing-masing zat berubah. Hasil uji stres dapat dilihat pada Gambar 4.14.

4.5 Pengukuran Kadar Isoniazid dan Pirazinamid dalam Sampel Tablet

Metode yang telah divalidasi selanjutnya digunakan untuk menguji 2 spesialit tablet kombinasi tetap yang beredar di pasaran, yang seterusnya akan disebut sampel A dan sampel B. Setelah 20 tablet dihitung bobot rata-ratanya dan digerus, sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL; ditambahkan sejumlah volume air, disonikasi selama 30 menit, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dengan air. Larutan kemudian dimasukkan ke tabung sentrifus dan disentrifugasi selama 15 menit, diambil bagian yang jernih dan selanjutnya larutan diencerkan dengan fase gerak sampai konsentrasi tertentu. Suntikkan larutan sebanyak 3 kali ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Contoh kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet dapat dilihat pada Gambar 4.13.

Bobot rata-rata sampel tablet A adalah 1098,2 mg dan tablet B 1100,8 mg. Dari hasil pengukuran, kedua sampel tablet masih memenuhi kriteria kadar isoniazid dan pirazinamid dalam tablet seperti yang ditetapkan oleh Farmakope Indonesia edisi IV (1995) yaitu tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Kadar isoniazid dan pirazinamid untuk sampel A berturut-turut sebesar 95,08% dan 98,60%, sementara untuk sampel B berturut-turut sebesar 97,71% dan 101,21%. Hasil statistik pengukuran kadar isoniazid dan pirazinamid dalam sampel tablet dapat dilihat pada Tabel 4.11.

4.6 Penyiapan Sampel Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Plasma

Penyiapan sampel dalam plasma dilakukan pada tabung mikro bertutup yang memiliki volume 1,5 mL. Untuk ekstraksi isoniazid dan pirazinamid dari plasma digunakan metode pengendapan protein dengan asetonitril sebagai larutan pengendap protein. Supernatan yang dihasilkan kemudian dipipet dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk selanjutnya proses penguapan menggunakan evaporator pada suhu 60°C. Proses penguapan ini dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi analit yang lebih banyak.

4.7 Validasi Metode Bioanalisis Campuran Isoniazid dan Pirazinamid dalam Plasma *In Vitro*

4.7.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma / Uji Spesifisitas

Uji ini dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya gangguan dari protein plasma pada waktu retensi zat aktif. Awalnya dilakukan deproteinasi dari plasma kosong dengan metode pengendapan protein. Setelah larutan plasma divortex dan disentrifugasi, diperoleh supernatan kemudian supernatan diuapkan dan siap disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu. Hasil pengotoran plasma dapat dilihat pada Gambar 4.15.

4.7.2 Pengukuran Limit Kuantitasi (LOQ) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Limit kuantitasi (LOQ) merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan dengan tetap memenuhi syarat akurasi dan presisi (FDA, 1994). Semakin kecil nilai LOQ menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Dalam analisis kadar obat dalam plasma, diperlukan suatu metode yang cukup sensitif yang dapat mengukur hingga konsentrasi terkecil obat dalam plasma.

Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan nilai LLOQ dilakukan dengan cara menyiapkan larutan campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dengan konsentrasi yang diturunkan dari LOQ. Konsentrasi LOQ didapat dari persamaan kurva kalibrasi dalam plasma yang telah dibuat sebelumnya. Sampel plasma dengan konsentrasi LLOQ disiapkan dalam 2 konsentrasi yaitu 2,37 $\mu\text{g/mL}$ dan 4,74 $\mu\text{g/mL}$ untuk isoniazid dan 8,00 $\mu\text{g/mL}$ dan 16,00 $\mu\text{g/mL}$ untuk pirazinamid. Konsentrasi LLOQ yang dipilih adalah konsentrasi yang memberikan nilai % *diff* sebesar $\pm 20\%$. Cara mendapatkan % *diff* dapat dilihat pada Rumus 4.10. Dari percobaan, diperoleh konsentrasi LLOQ sebesar 4,74 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai % *diff* berkisar antara 12,50 – 17,98% untuk isoniazid dan sekitar 7,98-17,16% untuk pirazinamid. Hasil statistik dari penentuan konsentrasi LLOQ dapat dilihat pada Tabel 4.12.

4.7.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Pengujian ini dimaksudkan untuk mengukur kemampuan suatu metode analisis dalam membedakan dan menghitung secara kuantitatif analit dalam matriks biologis. Uji selektivitas ini dilakukan pada konsentrasi LLOQ yaitu 4,74 $\mu\text{g/mL}$ untuk isoniazid dan 16,0 $\mu\text{g/mL}$ untuk pirazinamid dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Melalui hasil percobaan, diperoleh nilai koefisien variasi (KV) untuk isoniazid dan pirazinamid berturut-turut sebesar 4,87% dan 2,68% dan nilai % *diff* untuk masing-masing zat masih memenuhi syarat $\pm 20\%$ pada konsentrasi LLOQ. Data hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 4.13. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan isoniazid dan

pirazinamid pada konsentrasi LLOQ dan asam nikotinat sebagai baku dalam dapat dilihat pada Gambar 4.16.

4.7.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Kurva kalibrasi dibuat dari 7 seri konsentrasi campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma, termasuk konsentrasi LLOQ. Kurva kalibrasi sebaiknya disiapkan pada waktu yang bersamaan dengan penyiapan sampel dalam matriks biologis. Pada penelitian ini, kurva kalibrasi disiapkan setiap hari selama analisis berlangsung. Tujuan dari penyiapan kurva kalibrasi setiap hari adalah untuk meminimalisasi kesalahan yang disebabkan oleh kondisi alat KCKT antar hari.

Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh untuk isoniazid yaitu $y = 0,0431x - 0,0666$; sedangkan untuk pirazinamid yaitu $y = 0,6777x - 0,6020$. Berdasarkan hasil penelitian, metode ini memberikan linearitas yang baik yaitu sebesar $r = 0,9932$ untuk isoniazid dan $r = 0,9998$ untuk pirazinamid. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.14.

Kurva kalibrasi antar hari dibuat selama 5 hari, yaitu selama analisis parameter akurasi dan presisi berlangsung. Data kurva kalibrasi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.13. Berdasarkan hasil yang diperoleh, kurva kalibrasi antar hari masih memenuhi syarat linearitas dan presisi yang baik dimana nilai r yang dihasilkan mendekati 1 dan nilai koefisien variasinya (KV) pada konsentrasi LLOQ kurang dari 20% dan pada konsentrasi selain LLOQ kurang dari 15%.

4.7.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan yang digunakan untuk menguji parameter akurasi dan presisi merupakan larutan yang ditimbang terpisah dari kurva kalibrasi dan memiliki konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva kalibrasi. Menurut FDA (2001), larutan konsentrasi rendah berada pada sekitar 3 kali konsentrasi LLOQ, larutan konsentrasi sedang pada konsentrasi tengah kurva kalibrasi, dan larutan konsentrasi tinggi mendekati batas atas kurva kalibrasi. Oleh karena itu, untuk isoniazid dibuat konsentrasi rendah sebesar 14,00 $\mu\text{g/mL}$, konsentrasi sedang sebesar 18,00 $\mu\text{g/mL}$, dan konsentrasi tinggi sebesar 20,00 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi

untuk pirazinamid berturut-turut adalah 73,32 µg/mL, 94,27 µg/mL, dan 104,75 µg/mL.

Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama lima hari (akurasi dan presisi antar hari). Batas yang dapat diterima untuk uji akurasi dan presisi adalah $\pm 15\%$ untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi; kecuali pada kadar LLOQ diperbolehkan mencapai batas $\pm 20\%$ (FDA, 2001). Kromatogram plasma yang mengandung isoniazid dan pirazinamid dengan konsentrasi tinggi dapat dilihat pada Gambar 4.17.

Untuk uji akurasi intra hari, diperoleh rentang nilai *% diff* antara 0,70 - 12,35% untuk isoniazid dan 3,25 - 11,76% untuk pirazinamid. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 7,68%; 4,95%; dan 2,89% untuk isoniazid serta 6,12%; 8,56%; dan 8,74% untuk pirazinamid. Data statistik hasil uji akurasi dan presisi intra hari dapat dilihat pada Tabel 4.16.

Untuk uji akurasi antar hari, diperoleh rentang nilai *% diff* antara 0,07% - 14,50% untuk isoniazid dan 0,39% - 13,71% untuk pirazinamid. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi tidak melampaui $\pm 15\%$. Data statistik hasil uji akurasi dan presisi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.17 dan Tabel 4.18.

4.7.6 Uji Perolehan Kembali (*% Recovery*)

Pada uji perolehan kembali, digunakan 3 konsentrasi yaitu konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Uji perolehan kembali memberikan informasi mengenai efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis pada kondisi yang dapat mengalami perubahan.

Pada penelitian, dilakukan pengujian perolehan kembali yang hasilnya didapat dari data akurasi dan presisi antar hari. Nilai perolehan kembali pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi adalah 95,88%, 100,83%, dan 102,67% untuk isoniazid serta 100,67, 96,93%, dan 99,65% untuk pirazinamid. Data hasil uji perolehan kembali relatif dapat dilihat pada Tabel 4.19.

4.7.7 Uji Stabilitas

4.7.7.1 Stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw stability*)

Stabilitas beku dan cair dilakukan terhadap 2 konsentrasi, yaitu rendah dan tinggi. Sebanyak 0,3 mL plasma disiapkan pada kedua konsentrasi tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* pada suhu -20°C selama 12 jam atau lebih. Setelah itu, keluarkan plasma dari lemari pendingin dan cairkan tanpa bantuan pada suhu kamar. Ulangi proses tersebut hingga mencapai 3 siklus beku dan cair. Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.20. Setelah mengalami 3 siklus beku dan cair, baik isoniazid maupun pirazinamid dalam plasma masih menunjukkan kestabilannya dengan nilai *% diff* yang tidak melampaui $\pm 15\%$.

4.7.7.2 Stabilitas temperatur jangka pendek

Stabilitas jangka pendek dilakukan pada jam ke-6 dan jam ke-24 setelah penyimpanan pada suhu kamar. Berdasarkan hasil penelitian, baik isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai *% diff* terhadap jam ke-0 tidak melampaui $\pm 15\%$. Data hasil uji stabilitas jangka pendek dapat dilihat pada Tabel 4.21.

4.7.7.3 Stabilitas jangka panjang

Stabilitas jangka panjang dilakukan pada hari ke-0, hari ke-3, dan hari ke-7 setelah isoniazid dan pirazinamid disiapkan dalam plasma dan disimpan pada *freezer* dengan suhu -20°C . Setelah mencapai hari pengujian stabilitas yang ditentukan, tambahkan larutan baku dalam ke dalam plasma, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Berdasarkan hasil pengujian stabilitas, sampai hari ke-7 isoniazid dan pirazinamid dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai *% diff* tidak melampaui $\pm 15\%$. Data hasil uji stabilitas jangka panjang dapat dilihat pada Tabel 4.22.

4.7.7.4 Stabilitas larutan stok

Larutan stok isoniazid dan pirazinamid diuji stabilitasnya untuk memberikan efisiensi ketika bekerja. Apabila stabil, maka larutan stok yang

digunakan untuk memvalidasi metode tidak perlu dibuat baru setiap analisis. Hal ini akan sangat berguna bila zat aktif tersedia dalam jumlah terbatas.

Pengujian stabilitas larutan stok hendaknya dilakukan sampai periode analisis selesai dilaksanakan. Berdasarkan hasil penelitian, larutan stok tetap stabil sampai hari ke-17 pada penyimpanan suhu kulkas, yaitu 5°C. Data hasil uji stabilitas larutan stok dapat dilihat pada Tabel 4.23.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan analisis untuk senyawa isoniazid dan pirazinamid dapat dianalisis secara kromatografi cair kinerja tinggi.

5.1.1 Kondisi optimasi didapatkan dengan menggunakan kolom Shimpack[®] C₁₈ dan fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 - asetonitril (97:3) yang diatur dengan trietilamin untuk analisis dalam tablet, dan analisis dalam plasma menggunakan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 - asetonitril (99:1) yang diatur dengan trietilamin dan dengan laju alir 1,0 mL/menit, dideteksi pada panjang gelombang 242 nm.

5.1.2 Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria akurasi, presisi, linearitas, selektivitas, dan stabilitas sesuai ketentuan yang berlaku sehingga dapat digunakan untuk analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet dan plasma.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk dapat menggunakan larutan pengendap protein yang lain. Bila memungkinkan dapat pula digunakan cara ekstraksi protein dalam plasma yang lain, seperti ekstraksi cair-padat.

DAFTAR PUSTAKA

- Chuluq, A.C. (2004). Pengembangan Paket Obat SOT (Sediaan Obat Tunggal) Untuk Pengobatan Tuberkulosa. *Buletin Penelitian Kesehatan Volume 32, No 3*. 127-134.
- Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. (2005). Pharmaceutical Press.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia* (Edisi IV). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Fanina, S. (2010). Pemeriksaan Kadar Isoniazid Dalam Plasma Darah Pasien TB Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan Baku Dalam Nikotinamid. Medan: Universitas Sumatera Utara. 23 Desember 2010. <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/20640>
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for industry: Bioanalytical method validation*. 1-20. 23 Desember 2010. <http://www.fda.gov/downloads/DrugsGuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM070107.pdf>
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Gaillard, Y., & Pepin, G. (1997). Use of High-performance Liquid Chromatography with Photodiode-array UV Detection for the Creation of a 600-compound library, Application to Forensic Toxicology. *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*. USA: Wiley Interscience. 646.
- Gillman, A.G., et al. (1996). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9th ed). USA: Mc Graw-Hill.
- Hadjar, M. M. I. (1985). Teknik analisis obat dalam cairan biologis dengan GLC dan HPLC. *Cermin Dunia Kedokteran No. 37*. Jakarta : Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma. 13-17.
- Hansen, E., & Thompson, H., & Dooley, K. (1995). High-performance liquid chromatography analysis of the antituberculosis drugs aconiazide and isoniazide. *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*. USA: Wiley Interscience.

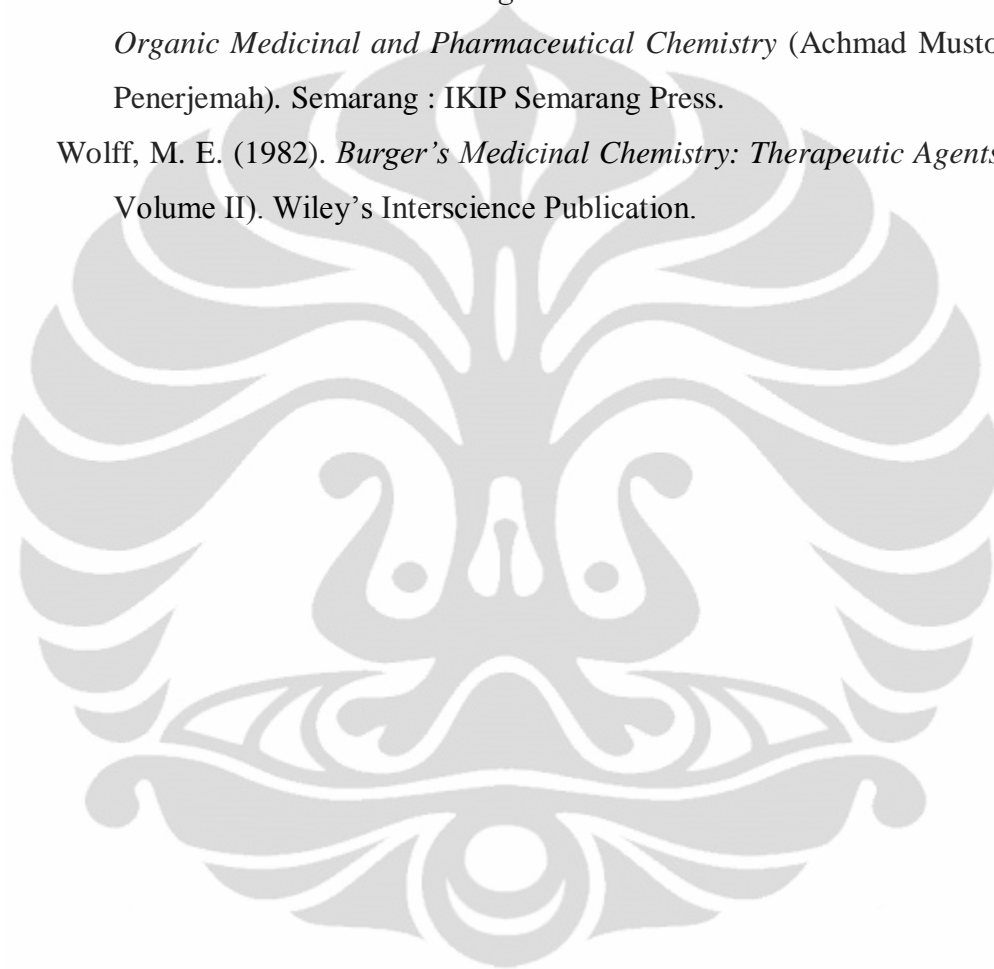
- Harahap, Y. (2010). Peran Bioanalisis dalam Penjaminan Kualitas Obat dan Peningkatan Kualitas Hidup Pasien. *Pidato pada Upacara Pengukuhan Sebagai Guru Besar Tetap dalam Bidang Ilmu Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia*. Depok: Penerbit Universitas Indonesia.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Holdiness, M.R. (1982). High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Isoniazid and Acetylisoniazid in Human Plasma. *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*. USA: Wiley Interscience. 755-756.
- Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia. (2007). *Informasi Specialite Obat*. Jakarta: Penerbit Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia.
- Istiantoro, Y. H., & Setiabudy, R. (2007). Tuberkulosis. *Farmakologi dan Terapi* (Edisi V). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. 613-633
- Katzung, B. G. (2005). Chapter 47: Antimycobacterial Drugs. *Basic and Clinical Pharmacology* (9th Ed). USA: McGraw-Hill.
- Mahjub, R., & Khalili, H., & Amini, M. (2010). Development and Validation of a Novel Gradient LC Method for Simultaneous Determination of Isoniazid and Acetylisoniazid in Human Plasma. *J. Chromatogr no 71, March 2010*.
- Martindale. (2007). *The Complete Drug Reference* (35th Ed). The Pharmaceutical.
- Muchtar, A. (1985). Monitoring Kadar Terapeutik Obat. *Cermin Dunia Kedokteran No. 37*. Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma. Jakarta. 13-17.
- Peloquin, C. A. (2008). Tuberculosis. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach* (7th Edition). USA: McGraw-Hill.
- Revankar, S.N., & Desai, N. D. & Vaidya, A.B. & Bhatt, A.D & Anjaneyulu, B. (1994). *Determination of pyrazinamide in human by high performance liquid chromatography*. 23 Desember 2010.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8568720
- Shargel, L., & A.B.C. Yu. (1988). *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan* (Edisi kedua). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* (Fasich, S. Sjamsiah, Penerjemah). Airlangga University Press, Surabaya.

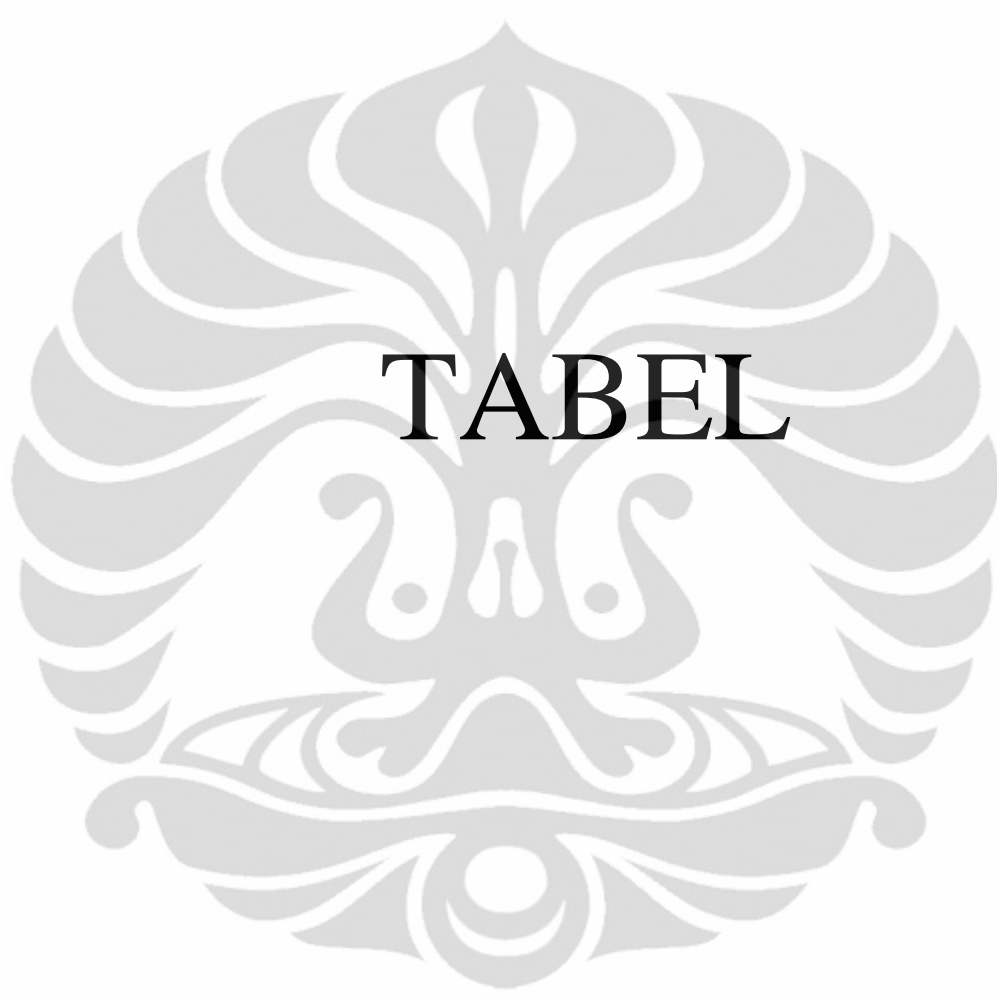
Unsalan, S., & Sancar, M., & Clark, M., & Karagoz, T., & Izzettin, F. V., & Rollas, S. (2005). Therapeutic Monitoring of Isoniazid, Pyrazinamide and Rifampicin in Tuberculosis Patients Using LC. *J. Chromatogr number 61*.

USP 32nd. (2009). USA: The United States Pharmacopeial.

Wilson, C.O., & Gisvold, O. (1982). *Buku Teks Wilson dan Gisvold Kimia Farmasi dan Medisinal Organik. Wilson's and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* (Achmad Mustofa Fatah, Penerjemah). Semarang : IKIP Semarang Press.

Wolff, M. E. (1982). *Burger's Medicinal Chemistry: Therapeutic Agents* (5th Ed., Volume II). Wiley's Interscience Publication.





Tabel 4.1. Data hasil pemilihan fase gerak untuk analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet

Fase gerak	Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3)		Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1)	
	INH	PZA	INH	PZA
Plat teoritis (N)	3824	4904	3869	5454
<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>	0,0065	0,0051	0,0064	0,0045
Faktor ikutan (Tf)	1,69	1,79	1,71	1,77
Rasio area	1 : 3,49		1 : 3,60	

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.2. Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam

Nilai	INH	PZA	As nikotinat
Waktu retensi (menit)	7,4	10,0	5,3
Resolusi	4,16	4,71	-

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikkan : 20,0 µL

Tabel 4.3. Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam

Nilai	INH	PZA	As nikotinat
Waktu retensi (menit)	11,7	16,0	7,7
Resolusi	6,51	5,23	-

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikkan : 20,0 µL

Tabel 4.4 Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis

Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)			Resolusi	
	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA
0,8	8,7	11,6	6,1	4,51	4,35
1,0	7,1	9,4	5,2	4,55	4,39
1.2	5,8	7,8	4,1	4,68	4,41

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikkan : 20,0 µL

Tabel 4.5 Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis

Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)			Resolusi	
	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA
0,8	14,0	19,1	9,1	6,33	5,17
1,0	11,18	15,20	7,2	6,51	5,23
1.2	9,2	12,5	6,0	6,40	5,26

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikkan : 20,0 µL

Tabel 4.6 Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Waktu Retensi (menit)			Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Rata-rata PAR		Koefisien Variasi (%)	
INH	PZA	Baku Dalam	Analit		Baku Dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
			INH	PZA							
7,430	10,03	5,539	69820	253032	124323	0,5616	2,0352	0,5572	2,0374	1,68	1,43
7,424	10,022	5,536	69796	250140	126009	0,5539	1,9851				
7,423	10,021	5,534	67823	250956	122708	0,5527	2,0451				
7,424	10,027	5,531	66966	245057	120723	0,5547	2,0299				
7,403	9,996	5,519	68370	254721	121923	0,5607	2,0892				
7,425	10,026	5,540	67829	247202	121181	0,5597	2,0399				

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikkan : 20,0 μL

Tabel 4.7 Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Waktu Retensi (menit)			Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Rata-rata PAR		Koefisien Variasi (%)	
INH	PZA	Baku Dalam	Analit		Baku Dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
			INH	PZA							
11,797	16,076	7,770	59041	249276	131348	0,4495	1,8978	0,4568	1,9076	1,58	1,70
11,780	16,046	7,751	65031	269688	142526	0,4563	1,8922				
11,799	16,119	7,772	64019	267254	141389	0,4528	1,8902				
11,796	16,105	7,747	70035	284600	150499	0,4653	1,8910				
11,793	16,063	7,752	68700	280097	147351	0,4662	1,9008				
11,766	16,042	7,737	64387	281663	142722	0,4511	1,9735				

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikkan : 20,0 μL

Tabel 4.8 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi standar
isoniazid dan pirazinamid

Konsentrasi isoniazid ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pirazinamid ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
0,9132	22290	4,7520	69247
1,2176	30530	6,3350	97004
1,5220	39550	7,9200	123348
1,8264	46005	9,5040	148339
2,1308	53945	11,0880	169250
2,4352	62491	12,6720	197648

Keterangan

Isoniazid

$a = -1170,86$

$b = 26065,79$

$r = 0,9992$

Batas deteksi (LOD) = $0,07 \mu\text{g/mL}$

Batas kuantitasi (LOQ) = $0,24 \mu\text{g/mL}$

Pirazinamid

$a = -4722,83$

$b = 15939,48$

$r = 0,9992$

Batas deteksi (LOD) = $0,08 \mu\text{g/mL}$

Batas kuantitasi (LOQ) = $0,28 \mu\text{g/mL}$

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, $5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 250 \text{ mm}$

Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)

Laju alir : $1,0 \text{ mL/menit}$

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikkan : $20,0 \mu\text{L}$

Tabel 4.9 Data hasil perhitungan akurasi isoniazid dan pirazinamid dalam tablet

Konsentrasi	Zat	Area ($\mu\text{V/s}$)	Jumlah yang ditambahkan		% Rekoveri
			Dalam tablet (mg)	Hasil penentuan (mg)	
80%	INH	27776	56,5	56,35	99,73
		27933		56,70	100,35
		27875		56,55	100,09
	Koefisien Variasi = 0,31%				
	PZA	100018	310,5	308,65	99,41
		101997		314,87	101,41
		100178		309,15	99,57
Koefisien Variasi = 1,11%					
100%	INH	36499	76,1	75,65	99,41
		37013		76,78	100,90
		36918		76,57	100,62
	Koefisien Variasi = 0,79%				
	PZA	125727	396,0	389,21	98,29%
		128284		397,20	100,31%
		126971		393,11	99,27%
Koefisien Variasi = 1,02%					
120%	INH	41396	87,9	86,48	98,39
		41780		87,33	99,35
		41913		87,62	99,69
	Koefisien Variasi = 0,68%				
	PZA	151404	464,2	469,65	101,61
		150465		466,70	100,97
		151882		471,14	101,93
Koefisien Variasi = 0,48%					

Kondisi analisis

Kolom	: Shimpack [®] ; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 242 nm
Volume penyuntikkan	: 20,0 μL

Tabel 4.10 Data hasil perhitungan presisi isoniazid dan pirazinamid dalam tablet

Bobot \tableted (mg)	Jumlah zat dalam tablet (mg)		Konsentrasi				% Rekoveri	
			Dalam tablet ($\mu\text{g/mL}$)		Hasil penentuan ($\mu\text{g/mL}$)			
	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
1124,4	75,2	397,3	1,504	7,946	1,520	8,004	101,13	100,73
1123,5	74,8	397,8	1,496	7,956	1,517	7,954	101,39	99,97
1017,1	67,6	359,6	1,352	7,190	1,327	7,329	98,82	101,91
1128,0	76,0	398,6	1,520	7,972	1,504	7,934	99,05	99,52
1123,0	74,6	396,9	1,493	7,938	1,511	7,904	101,31	99,58
1105,7	73,5	390,8	1,469	7,816	1,450	7,883	98,67	100,86
Koefisien Variasi (%)							1,46	0,92

Kondisi analisisKolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikkan : 20,0 μL

Tabel 4.11 Data hasil pengukuran kadar isoniazid dan pirazinamid dalam sampel tablet

Tablet	Bobot tablet (mg)	Area ($\mu\text{V/s}$)		Area rata-rata ($\mu\text{V/s}$)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		Kandungan dalam tablet (mg)		Kadar (%)	
		INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
A	1098,2	36742	128604	34539	127383	1,4262	7,8879	71,3119	394,3966	95,08	98,60
		35882	127797								
		32336	126163								
B	1100,8	32192	129013	35429	130720	1,4656	8,0970	73,2807	404,8503	97,71	101,21
		35887	130817								
		38667	132428								

Kondisi analisis

Kolom

: Shimpack; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak

: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)

Laju alir

: 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis

: 242 nm

Volume penyuntikkan

: 20,0 μL

Tabel 4.12 Data hasil penentuan nilai LLOQ

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)		Baku dalam	Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi		Koefisien Variasi (%)		% diff		
	INH	PZA		INH	PZA	INH	PZA		INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH
4,74	16,00	3608	251682	26049	0,1385	9,6619	3,9905	13,8722	3,97	0,10	0,66	2,64	4,70	-15,81	-13,30
		4008	277893	29847	0,1343	9,3106	3,8880	13,2543						-17,98	-17,16
		3984	257695	27481	0,1450	9,3772	4,1474	13,3715						-12,50	-16,43
		3668	270885	27049	0,1356	10,0146	3,9200	14,4927						-17,30	-9,42
2,37	8,00	3468	259687	25596	0,1355	10,1456	3,9172	14,7231	1,65	0,05	0,48	3,05	10,62	-17,36	-7,98
		1138	112584	25915	0,0439	4,3444	1,6945	4,5187						-37,93	-43,52
		1019	110293	25938	0,0393	4,2522	1,5822	4,3565						-42,04	-45,54
		1172	113948	27093	0,0433	4,2058	1,6786	4,2750						-38,51	-46,56
		1030	131002	24948	0,0453	5,2510	1,7280	6,1135					-36,70	-23,58	
		1009	108993	25998	0,0388	4,1924	1,5706	4,2513					-42,47	-46,86	

Kondisi analisisKolom : Shimpack[®], C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikkan : 20,0 μL

Tabel 4.13 Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi tenukur ($\mu\text{g/mL}$)			Rata-rata konsentrasi tenukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi		Koefisien Variasi (%)		% diff		
	INH	PZA	Baku dalam		INH	PZA	PZA		INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	
A	2323	227982	19250	0,1207	11,8432	4,3451	18,3639								
	2176	240369	21556	0,1009	11,1509	3,8874	17,3423								
C	2232	218395	19339	0,1154	11,2930	4,2231	17,5520	4,11	0,20	0,48	4,87	2,68			
	2439	262657	22546	0,1082	11,6498	4,0552	18,0785								
E	2046	223568	20365	0,1005	10,9781	3,8763	17,0873								
	2294	220586	19556	0,1173	11,2797	4,2669	17,5324								

Kondisi analisisKolom : Shimpack[®], C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikkan : 20,0 μL

Tabel 4.14 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi campuran isoniazid dan pirazinamid dalam plasma

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% diff	
	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
4,74	3100	244193	21975	0,1411	11,1123	4,5383	17,0798	-4,25	6,74
6,32	4172	530984	23402	0,1783	22,6897	5,3916	34,5419	-14,68	7,94
7,90	5830	632116	22563	0,2584	28,0156	7,2291	42,5750	-8,49	6,43
9,48	7742	628116	20846	0,3714	30,1312	9,8209	45,7660	3,59	-4,65
11,06	9035	705439	21056	0,4291	33,5030	11,1444	50,8516	0,76	-9,19
12,64	10575	923729	22443	0,4712	41,1589	12,1099	62,3989	-4,19	-2,50
23,70	24658	1988081	24548	1,0045	80,98749	24,3413	122,4722	2,70	2,06

Keterangan

Persamaan kurva kalibrasi :

Isoniazid : $y = 0,0436x - 0,0568$; $r = 0,9944$ Pirazinamid : $y = 0,6630x - 0,2114$; $r = 0,9971$ Kondisi analisisKolom : Shimpack®; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikkan : 20,0 μL

Tabel 4.15 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari isoniazid

(A) Kurva kalibrasi antar hari isoniazid

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	4,74	6,32	7,9	9,48	11,06	12,64	23,7	Intersep (a)	Kemiringan (b)	r	
											<i>Peak Area Ratio (PAR)</i>
Hari											
1	0,1217	0,1743	0,2902	0,3309	0,4036	0,4800	1,0190	-0,0680	0,0444	0,9935	
2	0,1188	0,1689	0,2847	0,3205	0,3918	0,4215	0,8955	-0,0416	0,0387	0,9951	
3	0,1366	0,1874	0,3012	0,3501	0,4112	0,4877	1,0384	-0,0615	0,0449	0,9944	
4	0,1528	0,1842	0,2671	0,3633	0,4330	0,4842	1,0293	-0,0580	0,0445	0,9948	
5	0,1411	0,1783	0,2584	0,3714	0,4291	0,4712	1,0045	-0,0568	0,0436	0,9943	
Rata-rata	0,1342	0,1786	0,2803	0,3472	0,4137	0,4689	0,9973				
SD	0,0141	0,0074	0,0174	0,0214	0,0173	0,0272	0,0583				
KV (%)	10,49	4,16	6,19	6,16	4,18	5,80	5,84				

SD = Standar Deviasi KV = Koefisien Variasi

(Lanjutan)

(B) Kurva kalibrasi antar hari pirazinamid

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	16	32	40	48	56	64	120	Intersep (a)	Kemiringan (b)	r
	Peak Area Ratio (PAR)									
Hari										
1	10,5966	20,6734	26,9444	29,5614	37,2149	40,0947	81,2993	-0,8321	0,6730	0,9985
2	9,7889	19,8978	24,6911	28,9856	36,3597	38,6975	78,1986	-0,9943	0,6505	0,9943
3	10,5487	23,6656	27,9949	29,8819	38,5199	41,6565	84,1023	-0,5631	0,6939	0,9979
4	10,5946	21,3856	26,3856	29,4487	37,5103	42,0687	82,6973	-1,0445	0,6874	0,9988
5	11,1123	22,6897	28,0156	30,1324	33,4987	41,1589	80,9875	-0,2116	0,6630	0,9970
Rata-rata	10,5282	21,6624	26,8063	29,6020	36,6207	40,7353	81,4570			
SD	0,4736	1,5196	1,3734	0,4373	1,9083	1,3573	2,2022			
KV (%)	4,49	7,01	5,12	1,47	5,21	3,32	2,7035			

SD = Standar Deviasi KV = Koefisien Variasi

Tabel 4.16 Data hasil presisi dan akurasi intra hari

Konsentrasi Sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Pegak Area Rata-rata (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		Standar Deviasi		Koefisien Variasi (%)		% diff	
	INH	Analit PZA	Baku Dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
14,00	11778	1324029	24958	0,4719	53,0503	12,2707	80,0630							-12,35	9,20
	10938	1057525	22544	0,4852	46,9094	12,5724	70,9383							-10,20	-3,25
	13897	1272410	25162	0,5523	50,5687	14,0978	76,3757	74,96	1,03	4,59	7,68	6,12	0,70	4,17	
18,00	12653	1097805	23920	0,5290	45,8949	13,5675	69,4308							-3,09	-5,30
	13493	1200382	23231	0,5808	51,6716	14,7459	78,0144							5,33	6,40
	16037	1201283	20158	0,7956	59,5934	19,6265	89,7852							9,04	-4,76
20,00	16587	1238896	21021	0,7891	58,9361	19,4788	88,8086							8,22	-5,79
	15083	1465246	21700	0,6951	67,5229	17,3425	101,5675	18,93	0,94	8,11	4,95	8,56	-3,65	7,74	
	17260	1327000	22701	0,7603	58,4556	18,8254	88,0946							4,59	-6,55
104,75	15986	1428597	20387	0,7841	70,0739	19,3665	105,3581							7,59	11,76
	17998	1649272	21595	0,8334	76,3729	20,4871	114,7176							2,44	9,52
	19002	1373618	21226	0,8952	64,7139	21,8914	97,3938							9,46	-7,02
104,75	19199	1416477	22212	0,8644	63,7708	21,1898	95,9924	102,92	0,61	9,00	2,89	8,74	5,95	-8,36	
	17394	1287450	20193	0,8614	63,7572	21,1224	95,9723							5,61	-8,38
	18008	1596874	21713	0,8294	73,5446	20,3947	110,5152							1,97	5,50

Tabel 4.17 Data hasil akurasi dan presisi antar hari isoniazid

	Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% <i>diff</i>
		INH	Baku Dalam						
Rendah (14,00 $\mu\text{g/mL}$)	1	11778	24958	0,4719	12,2707	13,45	1,03	7,68	-12,35
		10938	22544	0,4852	12,5724				-10,20
		13897	25162	0,5523	14,0978				0,70
		12653	23920	0,5290	13,5675				-3,09
		13493	23231	0,5808	14,7459				5,33
	2	11826	21589	0,5478	15,2294	14,09	0,77	5,48	8,78
		12193	23689	0,5147	14,3750				2,68
		10696	21447	0,4987	13,9617				-0,27
		12912	26487	0,4875	13,6714				-2,35
		10401	22187	0,4688	13,1883				-5,80
	3	11723	22900	0,5119	12,7733	13,49	1,21	8,93	-8,76
		10197	21430	0,4758	11,9694				-14,50
		12443	23202	0,5363	13,3160				-4,89
		12876	21828	0,5899	14,5097				3,64
		13296	21933	0,6062	14,8733				6,24
	4	10846	20103	0,5395	13,4274	13,59	0,93	6,86	-4,09
		11457	21193	0,5406	13,4518				-3,92
		11928	19385	0,6153	15,1308				8,08
		12309	22905	0,5374	13,3796				-4,43
		11911	23731	0,5019	12,5824				-10,13
5	10996	21369	0,5146	13,1050	12,81	0,27	2,10	-6,39	
	9361	18987	0,4930	12,6106				-9,92	
	10020	19556	0,5124	13,0545				-6,75	
	11880	23698	0,5013	12,8006				-8,57	
	12132	24876	0,4877	12,4885				-10,80	

(Lanjutan)

	Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		INH	Baku Dalam						
Sedang (18,00 $\mu\text{g/mL}$)	1	16037	20158	0,7956	19,6265	18,93	0,94	4,95	9,04
		16587	21021	0,7891	19,4788				8,22
		15083	21700	0,6951	17,3425				-3,65
		17260	22701	0,7603	18,8254				4,59
		15986	20387	0,7841	19,3665				7,59
	2	12637	19875	0,6358	17,5045	18,96	0,85	4,46	-2,75
		13434	18775	0,7155	19,5640				8,69
		15415	22005	0,7005	19,1763				6,53
		17561	24587	0,7142	19,5307				8,50
		16025	23054	0,6951	19,0364				5,76
	3	17057	22548	0,7565	18,2199	17,42	0,74	4,24	1,22
		15221	20988	0,7252	17,5239				-2,64
		17684	23759	0,7443	17,9489				-0,28
		14856	21151	0,7024	17,0151				-5,47
		14827	22009	0,6737	16,3759				-9,02
	4	12717	18375	0,6921	16,8558	17,39	0,66	3,78	-6,36
		13912	19945	0,6975	16,9779				-5,68
		14596	20578	0,7093	17,2427				-4,21
		15747	22046	0,7143	17,3546				-3,59
		17567	22948	0,7655	18,5059				2,81
5	16431	22115	0,7430	18,3436	18,88	1,25	6,64	1,91	
	18826	23698	0,7944	19,5232				8,46	
	14175	20818	0,6809	16,9198				-6,00	
	20484	25476	0,8041	19,7443				9,69	
	19169	23665	0,8100	19,8811				10,45	

(Lanjutan)

	Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		INH	Baku Dalam						
Tinggi (20,00 $\mu\text{g/mL}$)	1	17998	21595	0,8334	20,4871	21,02	0,61	2,89	2,44
		19002	21226	0,8952	21,8914				9,46
		19199	22212	0,8644	21,1898				5,95
		17394	20193	0,8614	21,1224				5,61
		18008	21713	0,8294	20,3947				1,97
	2	17606	21587	0,8156	22,1494	21,48	0,91	4,24	10,75
		14474	18756	0,7717	21,0155				5,08
		15896	20498	0,7755	21,1134				5,57
		18699	22354	0,8365	22,6898				13,45
		14890	19856	0,7499	20,4522				2,26
	3	19047	21496	0,8861	21,1063	20,23	1,31	6,46	5,53
		18639	23576	0,7906	18,9798				-5,10
		16903	20195	0,8370	20,0131				0,07
		17375	21864	0,7947	19,0709				-4,65
		20413	22046	0,9259	21,9939				9,97
	4	19148	23884	0,8017	19,3193	20,57	1,33	6,45	-3,40
		19699	21937	0,8980	21,4827				7,41
		17330	19446	0,8912	21,3300				6,65
		18833	23994	0,7849	18,9417				-5,29
		16816	18475	0,9102	21,7574				8,79
5	19312	22156	0,8716	21,2944	20,03	1,64	8,17	6,47	
	17012	23698	0,7179	17,7676				-11,16	
	18776	24502	0,7663	18,8786				-5,61	
	19491	22103	0,8818	21,5281				7,64	
	17029	20150	0,8451	20,6860				3,43	

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.18 Data hasil akurasi dan presisi antar hari dari pirazinamid

Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
	PZA	Baku Dalam						
1	1324029	24958	53,0503	80,0630	74,96	4,59	6,12	9,20
	1057525	22544	46,9094	70,9383				-3,25
	1272410	25162	50,5687	76,3757				4,17
	1097805	23920	45,8949	69,4308				-5,30
	1200382	23231	51,6716	78,0144				6,40
2	1048335	21589	48,5588	76,1769	76,20	5,65	7,41	3,90
	1110720	23689	46,8876	73,6078				0,39
	934184	21447	43,5578	68,4890				-6,59
	1340719	26487	50,6180	79,3425				8,21
	1181230	22187	53,2397	83,3728				13,71
3	1097871	22900	47,9420	69,9021	69,86	4,03	5,77	-4,66
	1010171	21430	47,1382	68,7437				-6,24
	1093938	23202	47,1484	68,7585				-6,22
	1145358	21828	52,4720	76,4304				4,24
	983848	21933	44,8570	65,4562				-10,73
4	1008345	20103	50,1589	74,4884	72,16	5,20	7,20	1,59
	975548	21193	46,0316	68,4842				-6,60
	1045764	19385	53,9471	79,9992				9,11
	1032759	22905	45,0888	67,1126				-8,47
	1128475	23731	47,5528	70,6971				-3,58
5	1065798	21369	49,8759	75,5467	73,21	5,42	7,41	3,04
	961499	18987	50,6399	76,6990				4,61
	1018918	19556	52,1026	78,9052				7,62
	1066853	23698	45,0187	68,2207				-6,95
	1094504	24876	43,9984	66,6817				-9,05

(Lanjutan)

	Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		PZA	Baku Dalam						
Sedang (94,27 $\mu\text{g/mL}$)	1	1201283	20158	59,5934	89,7852	94,72	8,11	8,56	-4,76
		1238896	21021	58,9361	88,8086				-5,79
		1465246	21700	67,5229	101,5675				7,74
		1327000	22701	58,4556	88,0946				-6,55
		1428597	20387	70,0739	105,3581				11,76
	2	1291849	19875	64,9987	101,4496	96,38	6,08	6,31	7,62
		1072163	18775	57,1059	89,3162				-5,25
		1358496	22005	61,7258	96,4336				2,30
		1627623	24587	66,1985	103,2941				9,57
		1348209	23054	58,4805	91,4293				-3,01
	3	1380337	22548	61,2177	89,0342	90,70	5,66	6,24	-5,55
		1239906	20988	59,0769	85,9490				-8,83
		1399870	23759	58,9196	85,7222				-9,07
		1365350	21151	64,5525	93,8400				-0,46
		1498857	22009	68,1020	98,9553				4,97
	4	1204856	18375	65,5704	96,9083	89,61	4,34	4,84	2,80
		1169957	19945	58,6592	86,8542				-7,87
		1212004	20578	58,8980	87,2017				-7,50
		1345854	22046	61,0475	90,3287				-4,18
		1344870	22948	58,6051	86,7755				-7,95
5	1434810	22115	64,8795	98,1766	89,47	5,88	6,57	4,14	
	1425641	23698	60,1587	91,0563				-3,41	
	1133095	20818	54,4286	82,4136				-12,58	
	1452428	25476	57,0116	86,3095				-8,44	
	1397832	23665	59,0675	89,4104				-5,15	

(Lanjutan)

Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
	PZA	Baku Dalam						
1	1649272	21595	76,3729	114,7176	102,92	9,00	8,74	9,52
	1373618	21226	64,7139	97,3938				-7,02
	1416477	22212	63,7708	95,9924				-8,36
	1287450	20193	63,7572	95,9723				-8,38
	1596874	21713	73,5446	110,5152				5,50
2	1646424	21587	76,2692	118,7756	105,58	10,27	9,73	13,39
	1166302	18756	62,1829	97,1209				-7,28
	1313297	20498	64,0695	100,0212				-4,51
	1395103	22354	62,4095	97,4694				-6,95
	1459386	19856	73,4985	114,5162				9,32
3	1648180	21496	76,6738	111,3084	102,06	5,32	5,21	6,26
	1589196	23576	67,4074	97,9543				-6,49
	1391294	20195	68,8930	100,0952				-4,44
	1497209	21864	68,4783	99,4976				-5,01
	1539176	22046	69,8166	101,4262				-3,17
4	1685993	23884	70,5909	104,2120	106,04	9,18	8,66	-0,51
	1609943	21937	73,3894	108,2831				3,37
	1498338	19446	77,0512	113,6102				8,46
	1477343	23994	61,5714	91,0907				-13,04
	1415609	18475	76,6229	112,9871				7,86
5	1544619	22156	69,7156	105,4709	106,98	7,67	7,17	0,69
	1509532	23698	63,6987	96,3956				-7,98
	1689543	24502	68,9553	104,3241				-0,41
	1646799	22103	74,5057	112,6957				7,59
	1545334	20150	76,6915	115,9926				10,73

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.19 Data hasil uji perolehan kembali

Rendah (14,00 µg/mL; 73,32 µg/mL)	Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur (µg/mL)		% Rekoveri		Rata-rata (%)		Koefisien Variasi (%)	
	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
	0,4719	53,0503	12,2707	80,0630	87,65	109,20	95,88	100,67	7,27	6,12
0,4852	46,9094	12,5724	70,9383	89,80	96,75					
0,5523	50,5687	14,0978	76,3757	100,70	104,17					
0,5478	48,5588	15,2294	76,1769	108,78	103,90					
0,5147	46,8876	14,3750	73,6078	102,68	100,39					
0,4987	43,5578	13,9617	68,4890	99,73	93,41					
0,5119	47,9420	12,7733	69,9021	91,24	95,34					
0,4758	47,1382	11,9694	68,7437	85,50	93,76					
0,5363	47,1484	13,3160	68,7585	95,11	93,78					
0,5395	50,1589	13,4274	74,4884	95,91	101,59					
0,5406	46,0316	13,4518	68,4842	96,08	93,40					
0,6153	53,9471	15,1308	79,9992	108,08	109,11					
0,5146	49,8759	13,1050	75,5467	93,61	103,04					
0,4930	50,6399	12,6106	76,6990	90,08	104,61					
0,5124	52,1026	13,0545	78,9052	93,25	107,62					

Sedang (18,00 µg/mL; 94,27 µg/mL)	Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur (µg/mL)		% Rekoveri		Rata-rata (%)		Koefisien Variasi (%)	
	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
	0,7956	59,5934	19,6265	89,7852	109,04	95,24	100,83	96,93	5,86	6,33
0,7891	58,9361	19,4788	88,8086	108,22	94,21					
0,6951	67,5229	17,3425	101,5675	96,35	107,74					
0,6358	64,9987	17,5045	101,4496	97,25	107,62					
0,7155	57,1059	19,5640	89,3162	108,69	94,75					
0,7005	61,7258	19,1763	96,4336	106,53	102,30					
0,7565	61,2177	18,2199	89,0342	101,22	94,45					
0,7252	59,0769	17,5239	85,9490	97,36	91,17					
0,7443	58,9196	17,9489	85,7222	99,72	90,93					
0,6921	65,5704	16,8558	96,9083	93,64	102,80					
0,6975	58,6592	16,9779	86,8542	94,32	92,13					
0,7093	58,8980	17,2427	87,2017	95,79	92,50					
0,7430	64,8795	18,3436	98,1766	101,91	104,14					
0,7944	60,1587	19,5232	91,0563	108,46	96,59					
0,6809	54,4286	16,9198	82,4136	94,00	87,42					

(Lanjutan)

	Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% Rekoveri		Rata-rata (%)		Koefisien Variasi (%)	
	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
Tinggi (20,00 $\mu\text{g/mL}$; 104,75 $\mu\text{g/mL}$)	0,8334	76,3729	20,4871	114,7176	102,44	109,52	102,67	99,65	6,17	6,93
	0,8952	64,7139	21,8914	97,3938	109,46	92,98				
	0,8644	63,7708	21,1898	95,9924	105,95	91,64				
	0,8156	76,2692	22,1494	118,7756	110,75	113,39				
	0,7717	62,1829	21,0155	97,1209	105,08	92,72				
	0,7755	64,0695	21,1134	100,0212	105,57	95,49				
	0,8861	76,6738	21,1063	111,3084	105,53	106,26				
	0,7906	67,4074	18,9798	97,9543	94,90	93,51				
	0,8370	68,8930	20,0131	100,0952	100,07	95,56				
	0,8017	70,5909	19,3193	104,2120	96,60	99,49				
	0,8980	73,3894	21,4827	108,2831	107,41	103,37				
	0,8912	77,0512	21,3300	113,6102	106,65	108,46				
	0,8716	69,7156	21,2944	105,4709	106,47	100,69				
	0,7179	63,6987	17,7676	96,3956	88,84	92,02				
	0,7663	68,9553	18,8786	104,3241	94,39	99,59				

Kondisi analisisKolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.20 Data uji stabilitas beku dan cair

Rendah										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% <i>diff</i>	
INH 14,02	PZA 72,80	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
0 siklus		12428	1065910	21405	0,5806	49,7972	14,6195	73,9622	4,28	1,60
		12384	1038273	22547	0,5493	46,0493	13,9003	68,5099	-0,85	-5,89
		13123	1120485	21689	0,6051	51,6614	15,1801	76,6742	8,27	5,32
3 siklus		11273	1034136	22502	0,5010	45,9575	12,7931	68,3764	-8,75	-6,08
		11651	966531	20409	0,5709	47,3581	14,3962	70,4138	2,68	-3,28
		10339	1086211	19751	0,5235	54,9952	13,3089	81,5241	-5,07	11,98
Tinggi										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% <i>diff</i>	
INH 20,03	PZA 104,00	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
0 siklus		15296	1362787	18756	0,8155	72,6587	20,0075	107,2201	-0,11	3,10
		17626	1570437	20365	0,8655	77,1145	21,1538	113,7022	5,61	9,33
		18376	1570188	21465	0,8561	73,1511	20,9379	107,9364	4,53	3,79
3 siklus		15058	1491360	19965	0,7542	74,6987	18,6014	110,1878	-7,13	5,95
		16807	1840770	23010	0,7304	79,9987	18,0555	117,8980	-9,86	13,36
		15077	1621874	20741	0,7269	78,1965	17,9752	115,2763	-10,26	10,84

Kondisi analisisKolom : Shimpack®; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 242 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.21 Data hasil uji stabilitas temperatur jangka pendek

Rendah										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% diff	
INH 14,02	PZA 72,80	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
Jam ke-0		11181	992338	18798	0,5948	52,7896	14,9449	78,3153		
		9897	1002766	19657	0,5035	51,0132	12,8506	75,7311		
		12626	1047416	21574	0,5852	48,5499	14,7257	72,1477		
Jam ke-6		9864	921954	19568	0,5041	47,1154	12,8644	70,0608	-9,24	-7,08
		9684	932336	20365	0,4755	45,7813	12,2092	68,1200	-13,86	-9,65
		10716	959034	21487	0,4987	44,6332	12,7413	66,4498	-10,11	-11,87
Jam ke-24		10984	998648	20587	0,5335	48,5087	13,5399	72,0877	-4,47	-4,39
		10468	958401	22102	0,4736	43,3626	12,1656	64,6015	-14,17	-14,32
		9938	957149	19876	0,5000	48,1560	12,7706	71,5747	-9,90	-5,07
Tinggi										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% diff	
INH 20,03	PZA 104,00	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
Jam ke-0		17084	1430259	20698	0,8254	69,1013	20,2338	102,0450		
		16770	1576915	21785	0,7698	72,3854	18,9586	106,8225		
		18141	1491471	20113	0,9020	74,1546	21,9898	109,3962		
Jam ke-6		17862	1463348	21556	0,8286	67,8859	20,3081	100,2768	-0,42	-5,48
		16067	1463366	20479	0,7846	71,4569	19,2972	105,4718	-5,38	-0,58
		15798	1410077	21986	0,7185	64,1352	17,7832	94,8205	-12,80	-10,62
Jam ke-24		15272	1355884	21468	0,7114	63,1584	17,6189	93,3994	-13,61	-11,96
		15187	1305785	20369	0,7456	64,1065	18,4035	94,7787	-9,76	-10,66
		14575	1342267	19756	0,7378	67,9422	18,2236	100,3588	-10,64	-5,40

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.22 Data hasil uji stabilitas jangka panjang

Rendah										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% diff	
INH 14,02	PZA 72,80	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
Hari ke-0		11181	992338	18798	0,5948	52,7896	16,4444	82,6808		
		9897	1002766	19657	0,5035	51,0132	14,0849	79,9500		
		12626	1047416	21574	0,5852	48,5499	16,1975	76,1633		
Hari ke-3		10484	875378	18556	0,5650	47,1749	14,2613	70,1474	-8,44	-11,87
		10739	896979	19104	0,5621	46,9524	14,1957	69,8237	-8,86	-12,28
		11606	918588	19963	0,5814	46,0145	14,6371	68,4593	-6,03	-13,99
Hari ke-7		9465	853856	18727	0,5054	45,5949	13,2719	68,1672	-14,79	-14,36
		8958	865643	17553	0,5103	49,3160	13,3861	73,6579	-14,06	-7,46
		10243	899913	19612	0,5223	45,8858	13,6632	68,5965	-12,28	-13,82
Tinggi										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% diff	
INH 20,03	PZA 104,00	INH	PZA	Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
Hari ke-0		17084	1430259	20698	0,8254	69,1013	22,4029	107,7565		
		16770	1576915	21785	0,7698	72,3854	20,9663	112,8050		
		18141	1491471	20113	0,9020	74,1546	24,3812	115,5248		
Hari ke-3		15296	1291780	18756	0,8155	68,8729	20,0075	101,7127	-11,41	-9,21
		17535	1319472	20365	0,8610	64,7912	21,0513	95,7747	-6,78	-14,51
		18376	1387586	21465	0,8561	64,6441	20,9379	95,5608	-7,29	-14,70
Hari ke-7		16284	1303844	19665	0,8281	66,3028	20,7580	98,7233	-8,08	-11,88
		18417	1498375	23010	0,8004	65,1184	20,1158	96,9757	-10,93	-13,44
		17745	1329892	20741	0,8556	64,1190	21,3956	95,5009	-5,26	-14,75

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

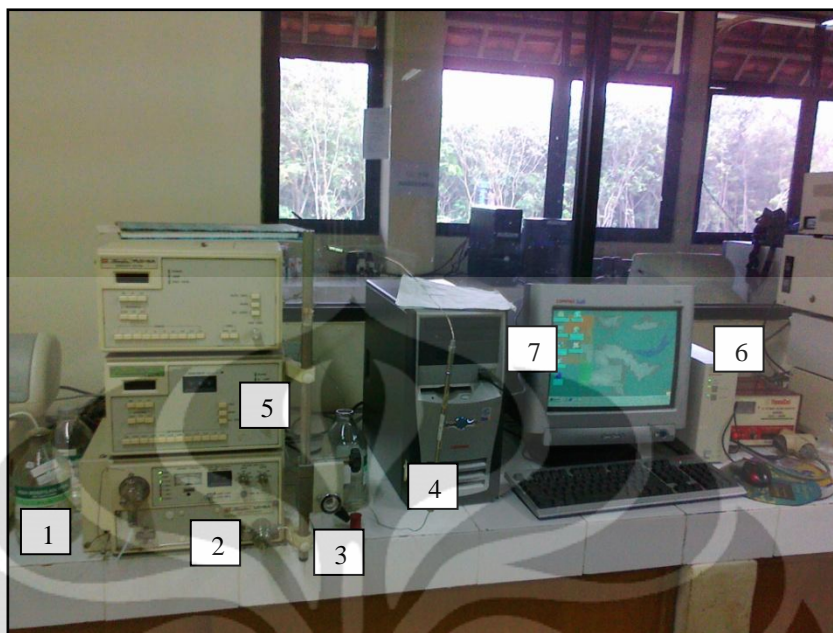
Tabel 4.23 Data hasil uji stabilitas larutan stok campuran
isoniazid dan pirazinamid

Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)		Rata-rata PAR		% diff	
	Analit		Baku dalam	INH	PZA	INH	PZA	INH	PZA
	INH	PZA							
0	61418	309332	125761	0,4884	2,4597	0,4830	2,4445		
	59658	303366	124879	0,4777	2,4293				
3	59175	300297	121205	0,4882	2,4776	0,4863	2,4815	1,08	1,35
	58633	300856	121053	0,4844	2,4853			0,28	1,67
7	60058	308447	124875	0,4809	2,4700	0,4795	2,4790	-0,43	1,05
	58887	306513	123201	0,4780	2,4879			-1,04	1,78
10	58953	300547	123564	0,4771	2,4323	0,4795	2,4396	-1,22	-0,50
	60448	306875	125414	0,4820	2,4469			-0,21	0,10
14	61028	308376	125986	0,4844	2,4477	0,4825	2,4459	0,29	0,13
	60937	309856	126774	0,4807	2,4442			-0,48	-0,01
17	59017	303871	123478	0,4780	2,4609	0,4815	2,4683	-1,04	0,67
	58987	301031	121598	0,4851	2,4756			0,43	1,27

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

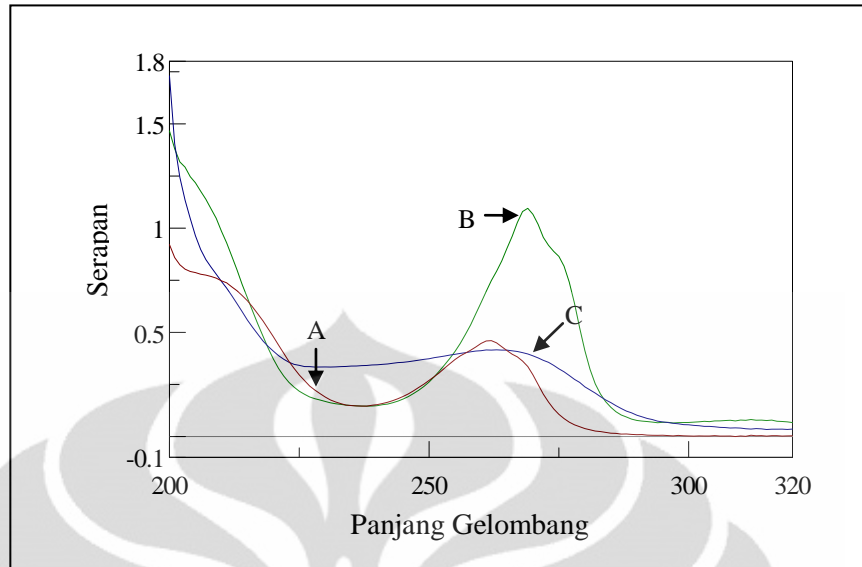




Keterangan:

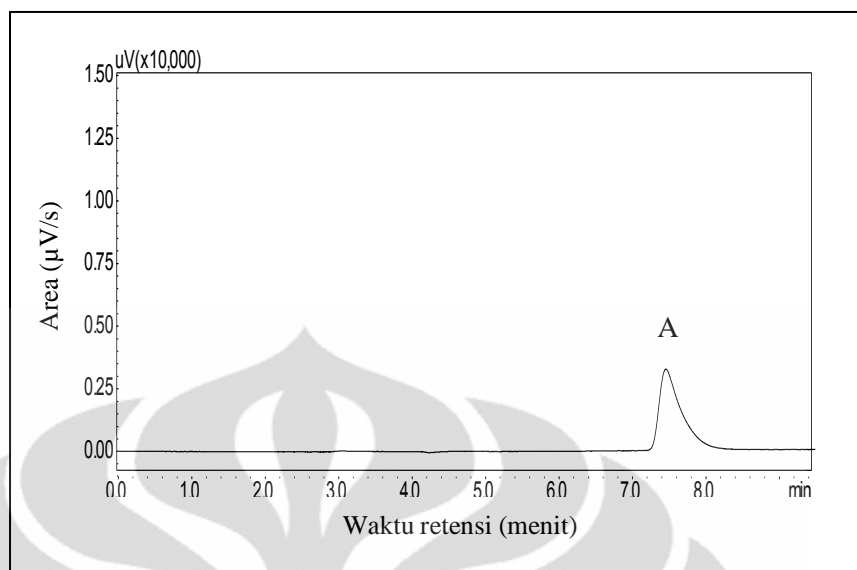
1. Wadah penampung fase gerak
2. Pompa Shimadzu LC-6A
3. Injektor
4. Kolom Shimpack[®] (4,6 x 250 mm; 5 μ m)
5. Detektor UV-Vis SPD-6A
6. Intergrator CBM-102
7. Komputer untuk memproses data

Gambar 4.1 Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)



Panjang gelombang optimum : 242 nm

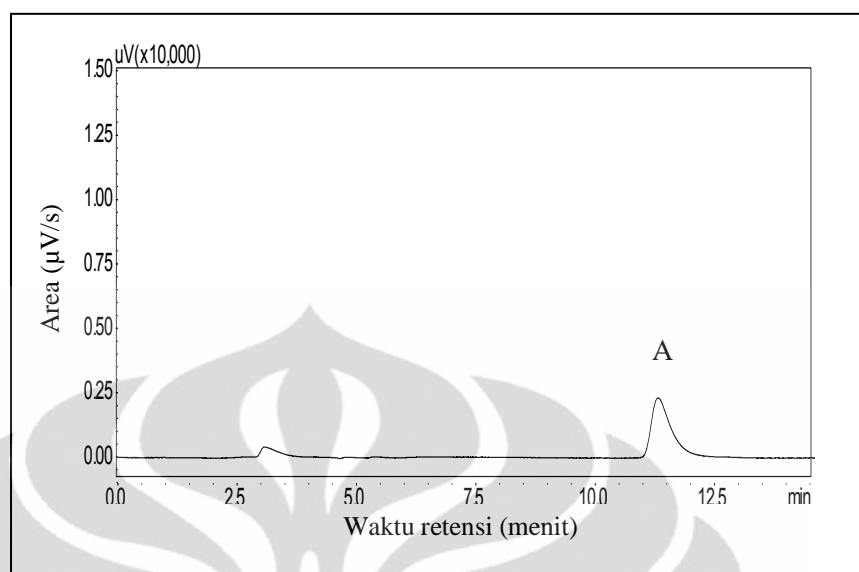
Gambar 4.2. Spektrum serapan isoniazid (A), pirazinamid (B), dan asam nikotinat (C) pada spektrofotometer



Keterangan

Kolom	: Shimpack [®] , C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 242 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 µL
Waktu retensi INH	: 7,4 menit

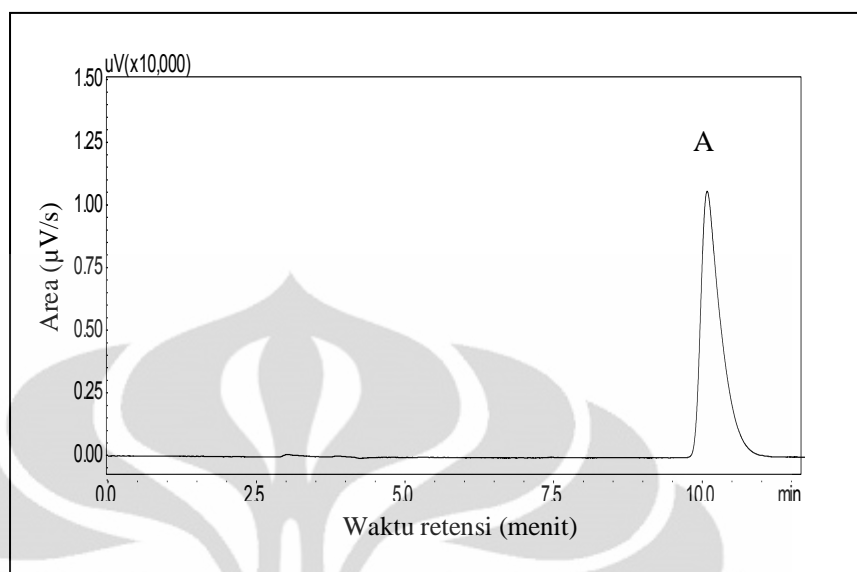
Gambar 4.3. Kromatogram larutan standar isoniazid (A)



Keterangan

Kolom : Shimpack[®], C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 242 nm
Volume penyuntikan : 20,0 μL
Waktu retensi INH : 11,3 menit

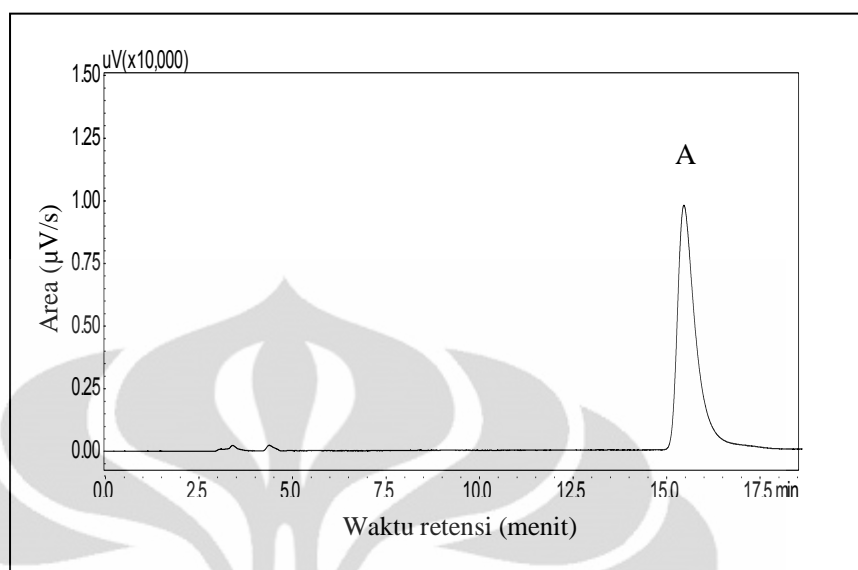
Gambar 4.4. Kromatogram larutan standar isoniazid (A)



Keterangan

Kolom	: Shimpack®, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 242 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 µL
Waktu retensi PZA	: 10,0 menit

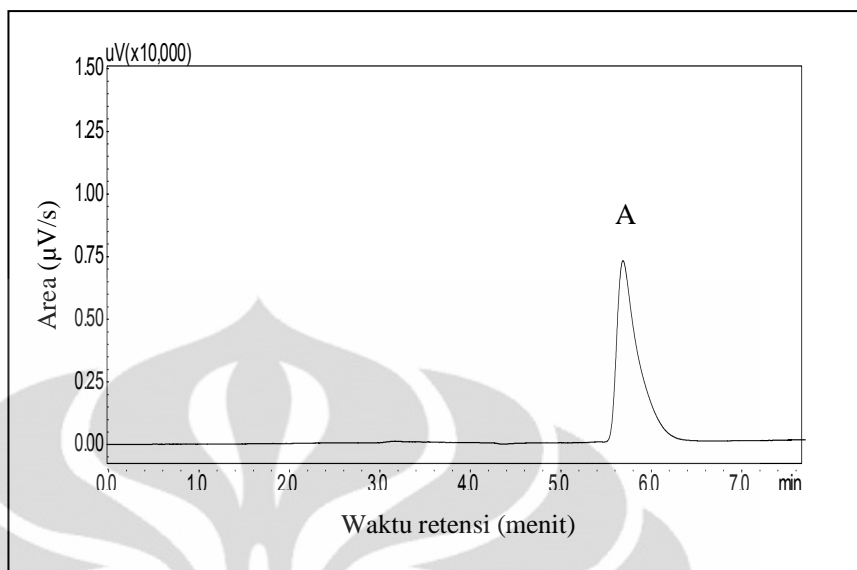
Gambar 4.5. Kromatogram larutan standar pirazinamid (A)



Keterangan

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 242 nm
Volume penyuntikan : 20,0 µL
Waktu retensi PZA : 15,6 menit

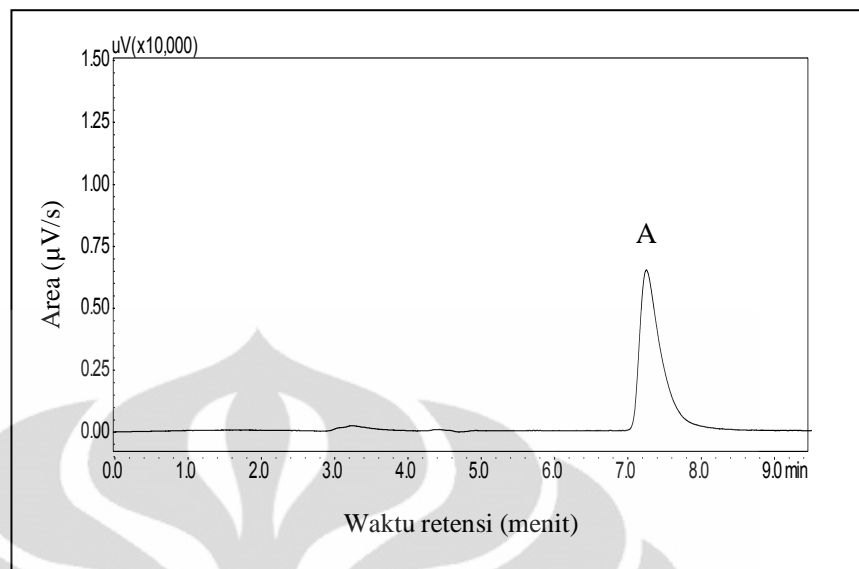
Gambar 4.6. Kromatogram larutan standar pirazinamid (A)



Keterangan

Kolom	: Shimpack [®] ; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 242 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 µL
Waktu retensi asam nikotinat	: 5,6 menit

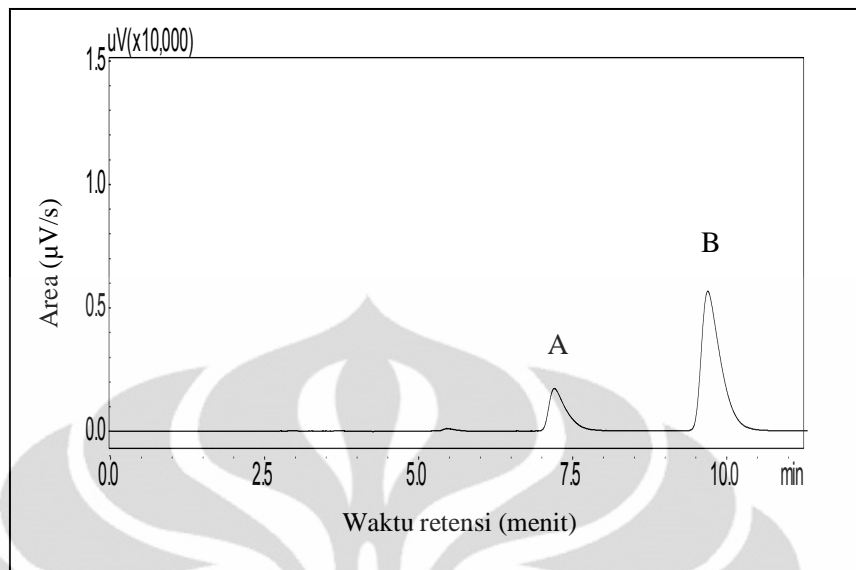
Gambar 4.7. Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A)



Keterangan

Kolom	: Shimpack [®] ; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 242 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 µL
Waktu retensi asam nikotinat	: 7,25 menit

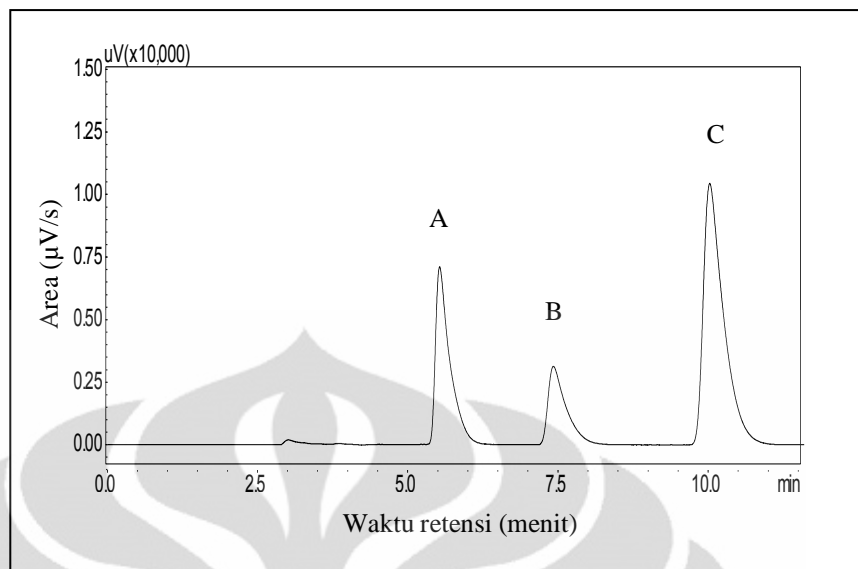
Gambar 4.8. Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A)



Keterangan

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 242 nm
Volume penyuntikan : 20,0 μL

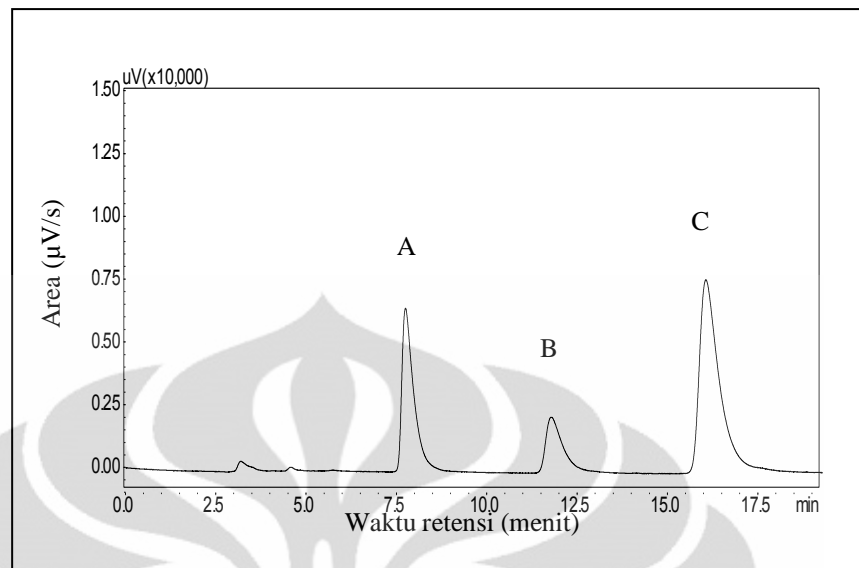
Gambar 4.9. Kromatogram larutan isoniazid (A) dan pirazinamid (B) dengan adanya rifampisin dan etambutol HCl



Keterangan

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 242 nm
Volume penyuntikan : 20,0 μL

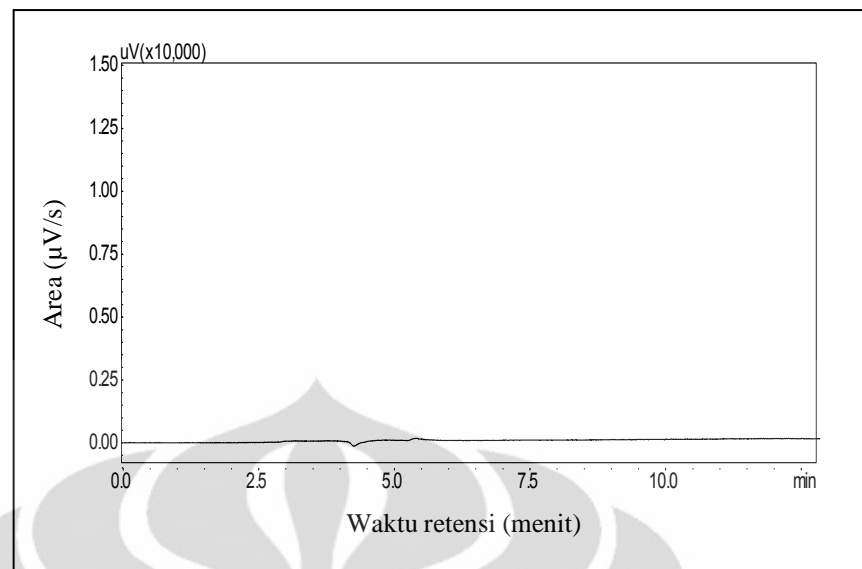
Gambar 4.10. Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A), isoniazid (B), dan pirazinamid (C)



Keterangan

Kolom : Shimpack[®], C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 242 nm
Volume penyuntikan : 20,0 µL

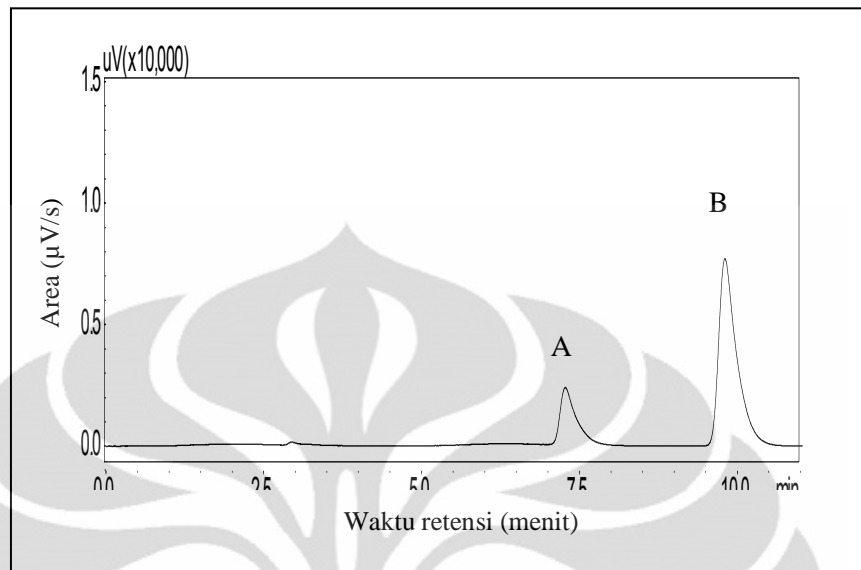
Gambar 4.11. Kromatogram larutan standar asam nikotinat (A), isoniazid (B), dan pirazinamid (C)



Keterangan

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 242 nm
Volume penyuntikan : 20,0 µL

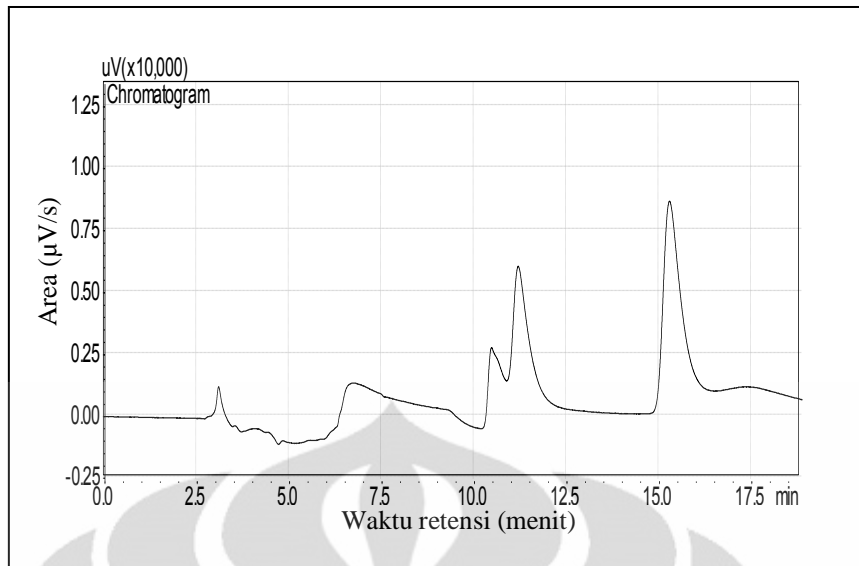
Gambar 4.12. Kromatogram hasil ekstraksi plasebo tablet



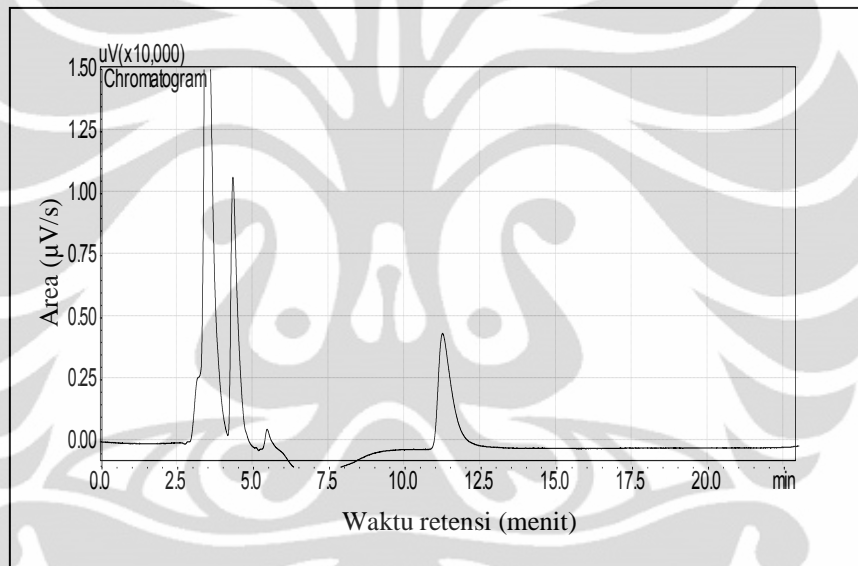
Keterangan

Kolom : Shimpack[®]; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Gambar 4.13. Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung isoniazid (A) dan pirazinamid (B)



(A)



(B)

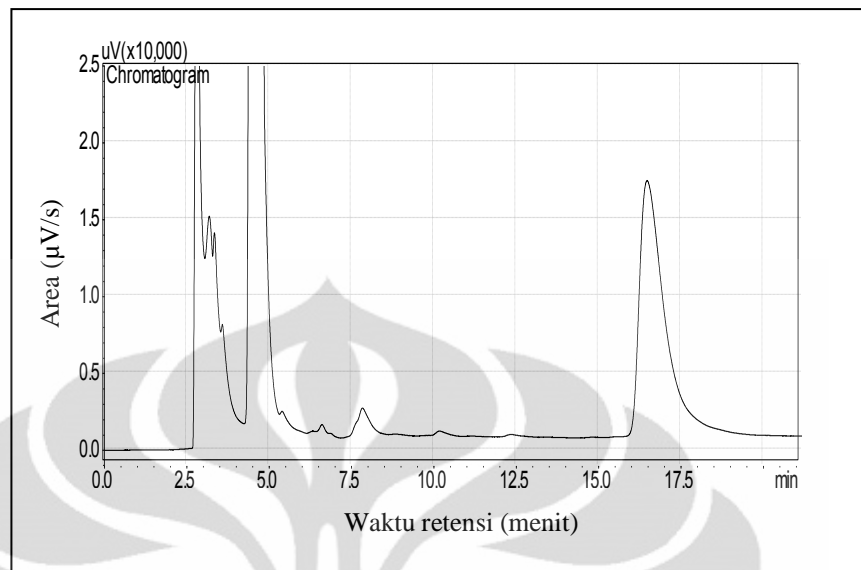
Keterangan

Kolom : Shimpack®; C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (97:3)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 242 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

(A) Setelah 24 jam penyimpanan dalam suasana asam (HCL 0,1 N)

(B) Setelah 24 jam penyimpanan dalam suasana basa (NaOH 0,1 N)

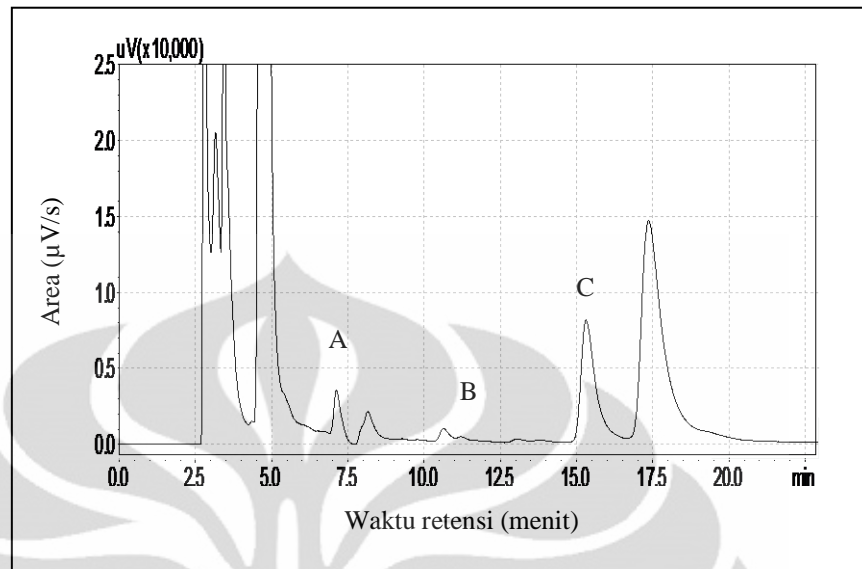
Gambar 4.14. Kromatogram hasil uji stres



Keterangan

Kolom : Shimpack[®], C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 242 nm
Volume penyuntikan : 20,0 µL

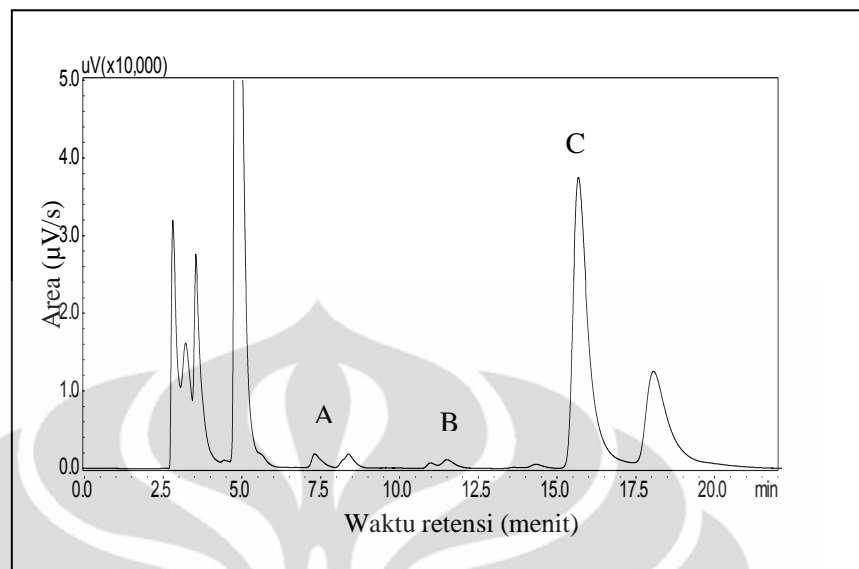
Gambar 4.15. Kromatogram ekstrak plasma kosong



Keterangan

Kolom	: Shimpack [®] ; C18, 5 μm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 242 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 μL

Gambar 4.16. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan isoniazid (B) dan pirazinamid (C) pada konsentrasi *LLOQ* dan asam nikotinat (A) sebagai baku dalam



Keterangan

Kolom	: Shimpack [®] ; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetonitril (99:1)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 242 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 μL

Gambar 4.17. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan isoniazid (B) dan pirazinamid (C) pada konsentrasi tinggi dan asam nikotinat (A) sebagai baku dalam



LAMPIRAN

Lampiran 1
Cara memperoleh efisiensi kolom

Jumlah plat teoritis :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4.1)$$

Height Equivalent to A Theoretical Plate :

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (4.2)$$

Faktor ikutan :

$$Tf = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4.3)$$

Dimana :

N = Jumlah pelat teoritis

HETP = *Height Equivalent to a Theoretical Plate*

Panjang lempeng teoritis

t_R = Waktu retensi

W = *Width*

Lebar puncak

L = *Length*

Panjang kolom

$W_{0,05}$ = Perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

Lampiran 2
Cara memperoleh resolusi

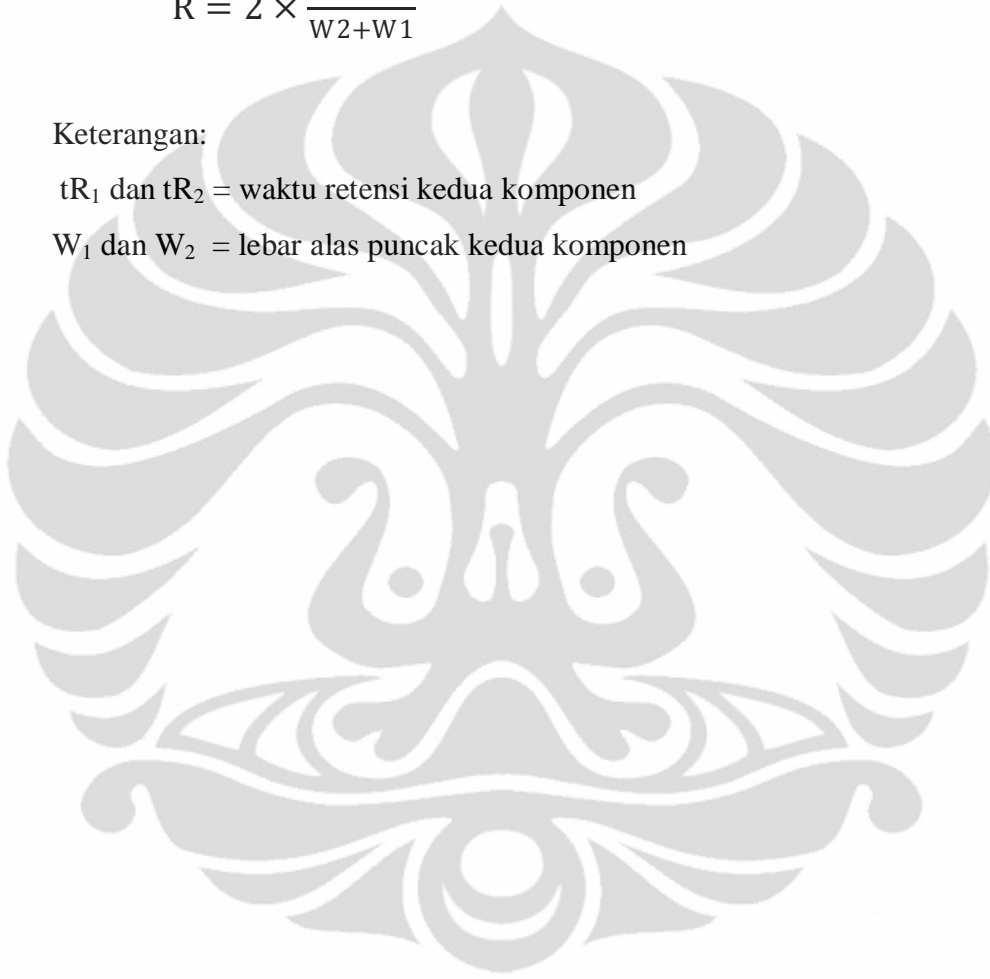
Resolusi atau daya pisah :

$$R = 2 \times \frac{tR_2 - tR_1}{W_2 + W_1} \quad (4.4)$$

Keterangan:

tR_1 dan tR_2 = waktu retensi kedua komponen

W_1 dan W_2 = lebar alas puncak kedua komponen



Lampiran 3
Cara memperoleh persamaan garis linear

Persamaan garis $y = a + bx$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus:

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i)^2 - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum y_i)^2}$$

$$b = \frac{n\sum x_i \cdot y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dengan rumus:

$$r = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{[(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)]^{1/2}} \quad (4.5)$$

Lampiran 4

Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi

Simpangan baku residual :

$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2} \right)^{1/2}$$

Limit deteksi; *Limit of Detection* (LOD) :

$$\text{LOD} = \frac{3S_{y/x}}{b} \quad (4.6)$$

Limit kuantitasi; *Limit of Quantitation* (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{10S_{y/x}}{b} \quad (4.7)$$

Lampiran 5
Cara perhitungan uji perolehan kembali

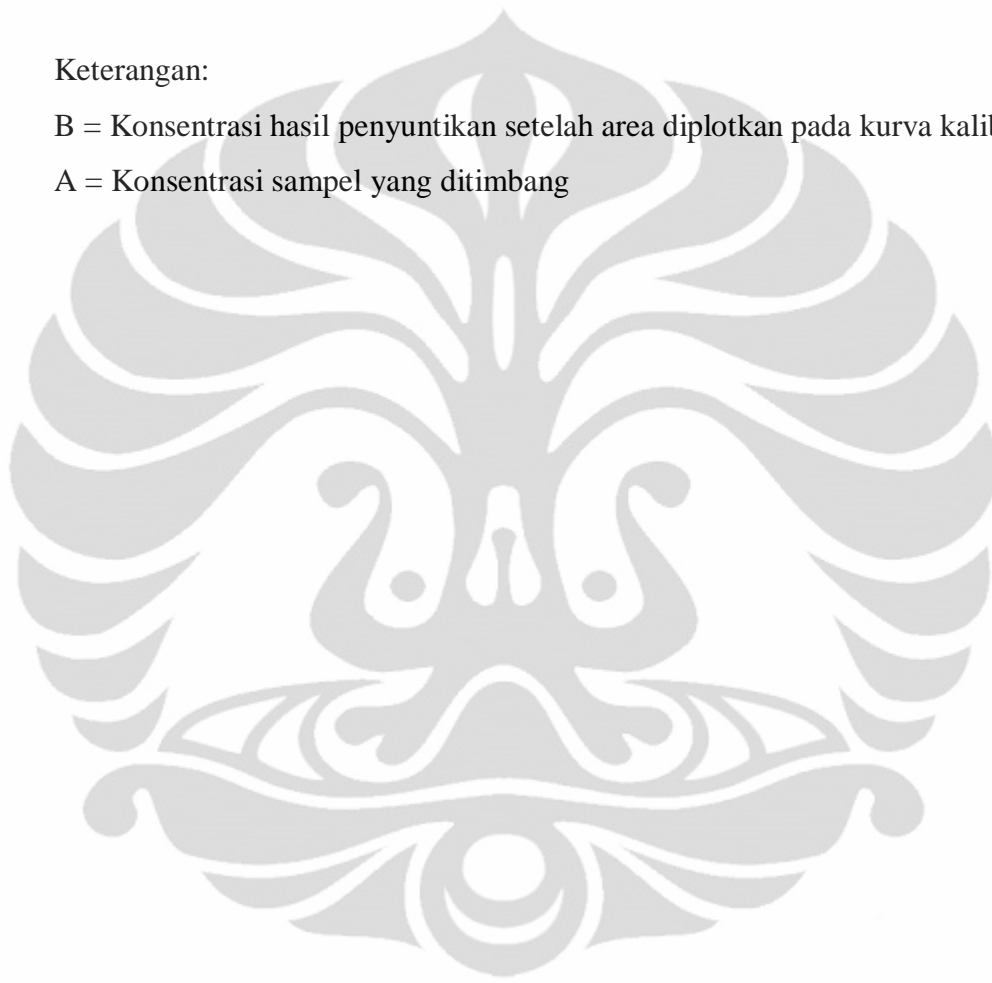
Persen perolehan kembali:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (4.8)$$

Keterangan:

B = Konsentrasi hasil penyuntikan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang



Lampiran 6
Cara perhitungan koefisien variasi

Rata-rata :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan deviasi :

$$SD = \left(\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{1/2}$$

Koefisien variasi :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

(4.9)

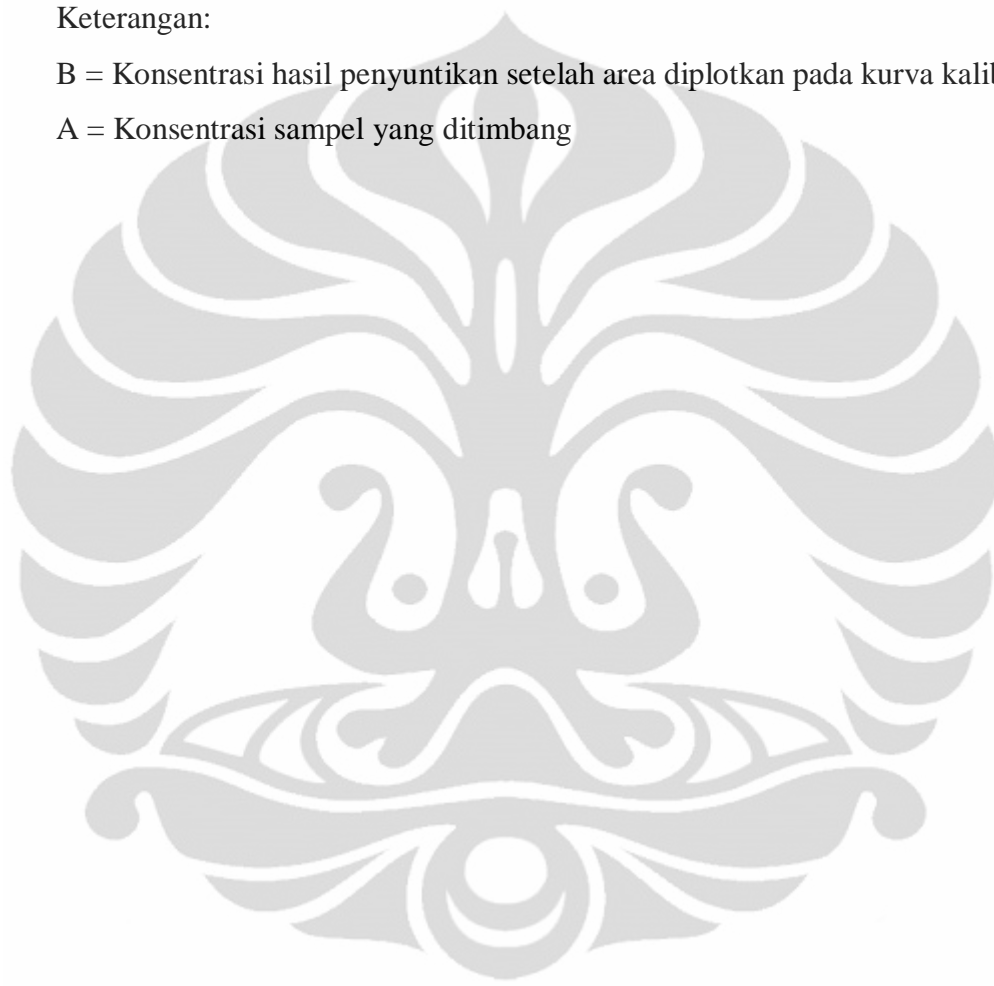
Lampiran 7
Cara perhitungan % *diff*

$$\% \text{ diff} = \frac{B-A}{A} \times 100\% \quad (4.10)$$

Keterangan:

B = Konsentrasi hasil penyuntikan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang



Lampiran 8
Sertifikat analisis isoniazid

kimia farma

Plant Jakarta
Jl. Rawagelam V No.1 Kawasan Industri Palogadung
Telp. +62 21 4609354. 4603144 Fax. + 62 21 4603143
e-mail : dppj@kf.net.id
Jakarta Timur 13930

No.Pemeriksaan : 00817 /BB/ 10
Tgl.Permohonan : 7 September 2010
Tgl.Pemeriksaan : 17 September 2010
C.A : Ada

22 SEP 2010

HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU

NAMA BAHAN BAKU : **ISONIAZIDUM (1000098)**
Isoniazid
MEREK BAHAN BAKU : Second Pharma Co. Ltd / China
JUMLAH KEMASAN : 17 vat @ 25 kg = 425 Kg
JUMLAH CONTOH : 5 x 10 g (1 - 5)

TGL.PEMBUATAN : 29 April 2010
DALUARSA : 29 April 2015
PEMASOK : PT. Tigaka Distrindo Perkasa
No.BATCH : P100506

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Pemerian	1 - 5 = Serbuk kristal berwarna putih, tidak berbau	Kristal tidak berwarna atau berwarna putih atau serbuk kntal berwarna putih	USP 31
Identifikasi	1 - 5 = Benar	-	USP 31
pH (1 g dalam 10 ml air)	6,88	6,0 - 7,5	MPPCO08
Susut pengeringan (105°C, 4 jam)	0,14%	Max. 1,0%	USP 31
Kadar	100,52%		USP 31
Kadar dihitung terhadap zat kering	100,66%	98,0% - 102,0%	USP 31

Kesimpulan : **DILULUSKAN/DIOLAK**
Catatan : **Bagian Pergudangan**
Diperiksa ulang
Tgl. :
Apoteker Penanggung Jawab PM

Jakarta, 18 September 2010
Asisten Pengawasan Mutu

Dra. Tia Mutianingsih
Dra. Hadi Kardoko

Lampiran 9
Sertifikat analisis pirazinamid

Amia farma

Plant Jakarta
Rawagelan V No. 1 Kawasan Industri Pulojading
Telp. +62 21 4609354, 4603144 Fax. + 62 21 4603143
e.mail : dpj@cbn.net.id
Jakarta Timur 13930

No. Pemeriksaan : 00944/BB/10
Tgl. Permohonan : 4 Oktober 2010
Tgl. Pemeriksaan : 13 Oktober 2010
C.A : Ada

19 OCT 2010

HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU

NAMA BAHAN BAKU : **PIRAZINAMID (1000094)**
Pyrazinamide BP / USP
MEREK BAHAN BAKU : Calyx Chemicals & Pharmaceutical Ltd/India
JUMLAH KEMASAN : 10 Drum @ 50 kg = 500 kg
JUMLAH CONTOH : 4 x 10 g (1 - 4)

TGL. PEMBUATAN : 31 Juli 2010
DALUARSA : 30 Juni 2015
PEMASOK : PT. Tatarasa Primatama
No. BATCH : PZ/20100762

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Pemeriksaan	1 - 4 = Serbuk kristal halus berwarna putih tidak berbau	Serbuk kristal berwarna putih sampai hampir putih.	USP 30
Identifikasi	1 - 4 = Benar	-	USP 30
Kadar air	0,12%	Max. 0,5 %	MPF0017
Kadar	99,76%	-	BP 2003
Kadar terhadap zat anhidrat	99,88%	99,0 - 100,50 %	BP 2003

Kesimpulan : **DILULUSKAN / DITOLAK**
Catatan : **Bagian Pergudangan**
Diperiksa ulang
Tgl. :
Apoteker Penanggung Jawab PM :
Jakarta, 13 Oktober 2010
Asman Pengawasan Mutu

Dra. Tia Mutianingsih **Dr. Hadi Kardoko**

Lampiran 10
Sertifikat analisis rifampisin

kimia farma

Plant Jakarta
Jl. Rawagelam V No. 1 Kawasan Industri Pulogadung,
Telp. +62 21 4609351, 4603144 Fax. +62 21 4603143
e-mail - dpj@cbn.net.id
Jakarta Timur 13930

No. Pemeriksaan : 01021/BB/10
Tgl. Permohonan : 25 Oktober 2010
Tgl. Pemeriksaan : 07 Nopember 2010
C.A : Ada

15 NOV 2010

HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU

NAMA BAHAN BAKU : **RIFAMPICIN POWDER (1003014)**
RIFAMPICIN
MEREK BAHAN BAKU : Hebei Xingang Pharmaceutical / China
JUMLAH KEMASAN : 20 vat @ 25 kg = 500 kg
JUMLAH CONTOH : 5 x 10 g (1 - 5)

TGL. PEMBUATAN : 19 September 2010
DALUARSA : 30 September 2014
PEMASOK : PT. Narda Tita
No. BATCH : 201039022

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Pemerian	1 - 5 = Serbuk kristal berwarna coklat kemerahan	Serbuk kristal ber warna coklat keme rahan atau merah kecoklatan	BP, 2009
Identifikasi	1 - 5 = Benar		BP, 2009
pH (Suspensi 1 % b/v dalam air bebas CO ₂)	5,35	4,5 - 6,5	BP, 2009
Susut pengeringan (80°C, 4 jam, vacuum)	0,52%	Max. 1,0 %	BP, 2009
Quinone	0,33%	Max. 1,0 %	MPBB1003014
Kadar	98,56%		BP, 2009
Kadar terhadap zat kering	99,08%	97,0 % - 102,0 %	BP, 2009
Disolusi	91,27% (92,93 - 93,59) %	Q ≥ 75 %	USP 32

Kesimpulan : **DILULUSKAN/DITOLAK**
Catatan : **Bagian Pergudangan**
Diperiksa ulang
Tgl.

Apoteker Penanggung Jawab PM
Dra. Tia Mutianingsih

Jakarta, 8 Nopember 2010
Asisten Pengawas Mutu
Drs. Hadi Kardoko

M. Rusdi / Putri

Lampiran 11
Sertifikat analisis etambutol HCl

Asma farma
Plant Jakarta
Rawagelan V No.1 Kawasan Industri Pulogadung
Telp. +62 21 4609354, 4603144 Fax. + 62 21 4603143
e-mail: dpp@cbn.net.id
Jakarta Timur 13930

No. Pemeriksaan : 00738/BB/10
Tgl. Permohonan : 25 Agustus 2010
Tgl. Pemeriksaan : 2 September 2010
C.A : Ada

07 SEP 2010
HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU

NAMA BAHAN BAKU : **ETHAMBUTOL HCl (1000095)**
Ethambutol Hydrochloride BP
MEREK BAHAN BAKU : Lupin Limited / India
JUMLAH KEMASAN : 10 Drum @ 25 kg = 250 kg
JUMLAH CONTOH : 4 x 10 g (1 - 4)

TGL. PEMBUATAN : 31 Mei 2010
DALUARSA : 30 April 2015
PEMASOK : PT. Global Chemindo Megatrading
No. BATCH : 102500585

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Pemerian	1 - 4 = Serbuk kristal berwarna putih, tidak berbau	Serbuk kristal berwarna putih.	USP 32
Identifikasi	1 - 4 = Benar		USP 32
Susut Pengeringan (105°, selama 2 jam)	0,02%	Max. 0,5%	USP 32
Kadar	100,01%		USP 32
Kadar dihitung terhadap zat kering	100,03%	98,0% - 100,5%	USP 32

Kesimpulan : **DILULUSKAN / DITOLAK**
Catatan : **Bagian Pergudangan**
Diperiksa ulang
Tgl.

Apoteker Penanggung Jawab PM
Dra. Tia Mutianingsih

Jakarta, 03 September 2010
Asma Pengawasan Mutu
Drs. Hadi Kardoko

PUTRI

Lampiran 12
Sertifikat analisis asam nikotinat

Certificate of Analysis
SIGMA-ALDRICH

Product Name	Nicotinic acid, ≥98%	
Product Number	N4126	
Product Brand	SIAL	
CAS Number	59-07-0	
Molecular Formula	C ₆ H ₅ NO ₂	
Molecular Weight	123.11	
TEST	SPECIFICATION	LOT 128K0006 RESULTS
APPEARANCE	WHITE TO OFF-WHITE POWDER	WHITE POWDER
SOLUBILITY	CLEAR COLORLESS TO VERY FAINT YELLOW SOLUTION AT 200MG PLUS 4ML OF 1M SODIUM HYDROXIDE	CLEAR COLORLESS SOLUTION
IR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONSISTENT
PURITY BY SODIUM HYDROXIDE TITRATION	NLT 98%	100%
PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY	NLT 98%	100%
RECOMMENDED RETEST	3 YEARS	DECEMBER 2011
QC RELEASE DATE		DECEMBER 2008

Rodney Burbach
Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

DAFTAR SINGKATAN

ETA	: Etambutol
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
INH	: Isoniazid
HETP	: <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> Ukuran efisiensi kolom; panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom.
HIV	: <i>Human Immunodeficiency virus</i>
KV	: Koefisien variasi; simpangan baku relatif.
LOD	: <i>Limit of Detection</i> Batas deteksi; jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko.
LLOQ	: <i>Lower Limit of Quantitation</i> Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dan memenuhi kriteria cermat dan seksama.
LOQ	: <i>Limit of Quantitation</i> Batas kuantitasi; kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.
N	: Jumlah plat teoritis.
OAT	: Obat antituberkulosis
PAR	: <i>Peak Area Ratio</i> Perbandingan antara area analit dengan area baku dalam.
PZA	: Pirazinamid
r	: Koefisien korelasi, linearitas dari garis regresi.
RIF	: Rifampisin
SD	: Simpangan baku
Tf	: <i>Tailing factor</i> Faktor ikutan; perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak dibagi dua kali jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.
WHO	: <i>World Health Organization</i>
% diff	: Persentase perbedaan hasil terukur dengan hasil sebenarnya dibandingkan dengan hasil sebenarnya.
% recovery	: Efisiensi ekstraksi dari proses analisis; dinyatakan sebagai persentase terhadap konsentrasi yang diketahui setelah sampel diekstraksi dan diproses.