

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Isoniazid adalah obat anti TB lini pertama yang telah digunakan sejak tahun 1952 dalam pengobatan dan pencegahan tuberkulosis (TB). Isoniazid dapat diberikan sebagai terapi tunggal untuk profilaksis maupun sebagai kombinasi dengan Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lain. Isoniazid merupakan salah satu OAT yang memiliki efek paling kuat terhadap *M. tuberculosis* dan yang paling sering digunakan (Weisiger, 2007).

Validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl (vit B6) dalam sediaan sirup perlu dilakukan untuk menjamin bahwa obat yang diproduksi pabrik memenuhi persyaratan yang ditetapkan. Obat yang dikonsumsi akan memberikan efek terapi jika kadarnya berada di rentang persyaratan yang ditetapkan. Apabila kadar obat berada di atas rentang persyaratan maka obat tersebut akan memberikan efek toksik terhadap konsumen. Sedangkan bila berada di bawah rentang persyaratan, maka obat tersebut tidak akan memberikan efek terapi (Arini dkk., 2011).

Menurut Farmakope Indonesia edisi V (2014), isoniazid dapat ditetapkan kadarnya dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. Fase gerak dibuat dengan melarutkan 4,4 g natrium dokusat P dalam 600 ml methanol P, ditambahkan 400 ml air. Pyridoxin HCl juga dapat ditetapkan kadarnya dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Namun fase gerak dibuat dengan mencampurkan

20 ml asam asetat glasial P, 1,2 g natrium l-heksansulfonat P dan lebih kurang 1400 ml air dalam labu terukur 2000 ml.

Moussa dkk., (2002) telah melakukan monitoring efek terapeutik isoniazid dengan metode HPLC sederhana dengan deteksi UV. Fase diam yang digunakan C18 dan fase gerak yang digunakan dapar ammonium asetat dan asetonitril (99:1) v/v . Penelitian tersebut memenuhi parameter validasi.

Optimasi dan validasi metode analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet 4 fixed dose combination (4FDC) dan plasma in vitro secara KCKT dilakukan oleh Stella (2011). Sistem kromatografi terdiri dari kolom Shimpack C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) untuk dianalisis didalam tablet dan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) untuk dianalisis pada plasma manusia secara in vitro. Pada validasi tablet, metode dinyatakan linear dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk isoniazid dan pirazinamid berturut-turut 0,9992 dan 0,9992.

Penelitian yang dilakukan oleh Hidayatullah (2011), yaitu validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan tablet dengan Spektrofotometri UV dengan tiga panjang gelombang. Hasil yang diperoleh antara lain terpenuhinya persyaratan parameter validasi kategori I maka metode yang digunakan pada penelitian tersebut dikatakan valid.

Lystiani (2015) telah melakukan validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan sirup dengan metode Spektrofotometri UV secara simultan. Digunakan perbandingan isoniazid 50 ppm dan pyridoxin

HCl 5 ppm (10:1) dalam pelarut air dengan panjang gelombang 262,0 nm dan 285,5 nm. Dari hasil penelitian Lystiani dapat disimpulkan bahwa metode Spektrofotometri UV secara simultan untuk penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan sirup sudah memenuhi persyaratan validasi.

Kegiatan validasi metode analisis produk farmasi harus dilakukan mulai dari Industri Farmasi yang memproduksi untuk menjamin khasiat dan kualitas produk farmasi, hingga laboratorium lain yang melakukan analisis pada produk farmasi tersebut. Kegiatan validasi metode analisis dilakukan untuk mendokumentasikan bukti-bukti bahwa metode analisis yang digunakan selalu memberikan hasil analisis yang diinginkan sesuai dengan spesifikasi, sehingga hasil analisis dari suatu metode analisis yang telah divalidasi dapat dipercaya secara ilmiah. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dengan metode KCKT dan aplikasinya dalam sediaan sirup.

B. Perumusan Masalah

Dari uraian latar belakang masalah, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl menggunakan KCKT dapat dilakukan?
2. Apakah uji validasi pada metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas ?

3. Apakah metode yang telah divalidasi untuk penetapan kadar isoniazid dan pyridoxine HCl dapat diaplikasikan dalam sediaan sirup?

C. Tujuan Penelitian

1. Melakukan validasi terhadap metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl menggunakan KCKT.
2. Melakukan validasi pada metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxine HCl menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas.
3. Mengaplikasikan metode yang telah divalidasi untuk penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan sirup.

D. Manfaat Penelitian

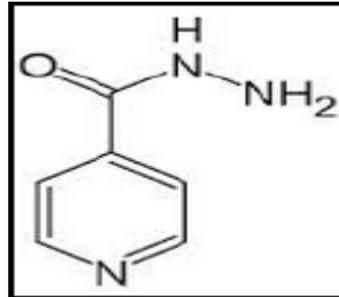
Penelitian ini diharapkan menghasilkan metode yang dapat digunakan sebagai acuan untuk analisis campuran isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan sirup.

E. Tinjauan Pustaka

1. Isoniazid

Isoniazid mempunyai rumus molekul $C_6H_7N_3O$ dengan berat molekul 137,1 g/mol. Nama kimia dari isoniazid adalah asam isonikotinat hidrazida [54-85-3]. Pemeriananya berupa hablur atau serbuk hablur, putih atau tidak berwarna, tidak berbau, perlahan-lahan dipengaruhi oleh udara dan cahaya.

Kelarutan isoniazid yaitu mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, sukar larut dalam kloroform dan eter. Struktur kimia isoniazid ditunjukkan oleh gambar 1 (Depkes RI, 2014).



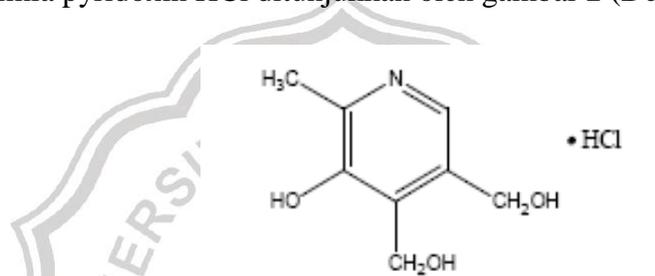
Gambar 1. Struktur Kimia Isoniazid (Depkes, 2014)

Mekanisme kerja dari isoniazid yaitu menghambat jalur biosintesis dari asam mikolat dengan menghambat pembentukan rantai asam lemak yang sangat panjang yang merupakan bentuk awal molekul asam mikolat (Istiantoro dan Setiabudi, 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 sedang tumbuh aktif (Istiantoro dan Setiabudi, 2007) dan pada sebagian 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 dan Setiabudi, 2007). Efek samping yang terpenting adalah defisiensi pyridoxin yang mengakibatkan neuritis perifer. Pyridoxin HCl 10-50 mg biasanya diberikan sebagai profilaksis dari neuritis perifer dengan penggunaan isoniazid (Martindale 35, 2007).

2. Pyridoxin HCl

Pyridoxin HCl mempunyai rumus molekul $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ dengan berat molekul 205,64 g/mol. Nama kimia dari pyridoxin HCl adalah piridoksol hidroklorida [58-56-0]. Pemerianaanya berupa hablur atau serbuk hablur, putih atau hampir putih, stabil di udara, perlahan-lahan dipengaruhi cahaya matahari. Kelarutan pyridoxin HCl yaitu mudah larut dalam air, sukar larut dalam etanol, tidak larut dalam eter, larutan mempunyaipH lebih kurang 3. Struktur kimia pyridoxin HCl ditunjukkan oleh gambar 2 (Depkes RI, 2014).



Gambar 2. Struktur Kimia pyridoxin HCl (Depkes RI, 2014)

Pyridoxin HCl merupakan koenzim yang berperan penting dalam metabolisme berbagai asam amino didalam tubuh. Dengan adanya pyridoxin, asam amino dapat diserap tubuh oleh usus dan digunakan untuk berbagai keperluan dalam tubuh. Vitamin ini juga berperan dalam pemecahan protein dan sintesis asam amino. Selain sebagai suplemen kesehatan, pyridoxin digunakan juga untuk memulihkan suatu penyakit. Pyridoxin diindikasikan untuk defisiensi vit B6, untuk mencegah atau mengobati neuritis perifer oleh obat misalnya isoniazid, hidralazin yang bekerja sebagai antagonis pyridoxin (Spinneker dkk, 2007).

3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Hal ini karena didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi dan detektor yang sensitif dan beragam. KCKT mampu menganalisis berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Depkes RI, 1995).

Isoniazid dan pyridoxin dapat ditetapkan kadarnya dengan menggunakan KCKT karena mengandung unsur elektronegatif yang menjadikan polar sehingga dapat dipisahkan dengan KCKT dan juga memiliki gugus kromofor sehingga dapat dianalisis dengan detektor UV (Depkes RI, 2014).

Kelebihan metode KCKT adalah mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, mudah melaksanakannya, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis, resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor, kolom dapat digunakan kembali dan mudah melakukan perolehan kembali (Putra, 2004). Keterbatasan metode KCKT adalah jika sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Gandjar dan Rohman, 2007).

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas enam komponen pokok, yaitu (Harmita, 2004):

a. Wadah fase gerak

Wadah fase gerak digunakan sebagai tempat persediaan fase gerak.

b. Sistem penghantaran fase gerak/pompa

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

c. Alat untuk memasukkan sampel/injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan sampel ke dalam kolom. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kelebihannya dikeluarkan ke pembuangan.

d. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom yang baik memiliki *high equivalent theoretical plate* (HETP) yang kecil dan jumlah plat teoritis 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.

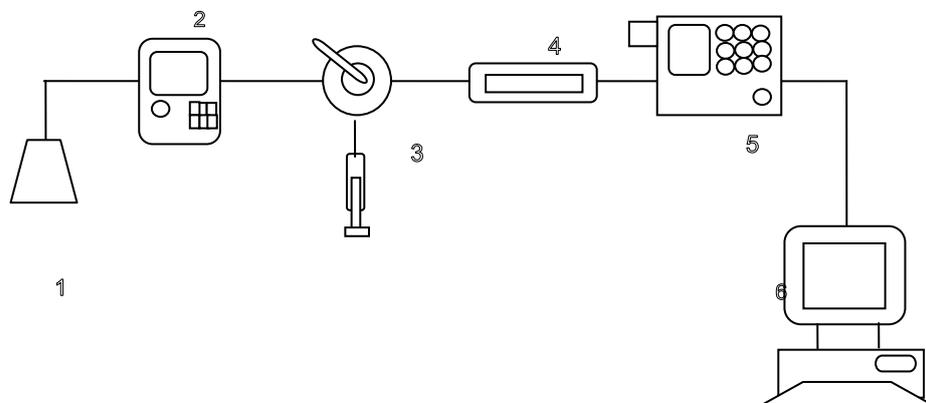
e. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi solut yang terdapat pada analit. Detektor UV merupakan detektor yang paling sering digunakan pada analisis farmasi.

f. Suatu komputer atau integrator atau perekam.

Suatu komputer atau integrator atau perekam merupakan alat pengumpul data yang dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu mem-plotkannya sebagai suatu kromatogram.

Skema komponen KCKT dapat dilihat pada gambar 3 :



Gambar 3. Skema Komponen KCKT (Ardianingsih, 2009)
 Eluent/wadah fase gerak (1), pompa (2), injektor (3),
 kolom (4), detektor (5), pengolah data (6).

4. Validasi

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium yang bertujuan untuk menunjukkan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan (Harmita, 2004). Validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduisibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Anonim, 2007).

Kategori metode pengujian dengan validasi metode yang diperlukan adalah sebagai berikut (Gandjar dan Rohman, 2007)

a. Kategori I

Metode analisis yang digunakan untuk penentuan kuantitatif komponen-komponen utama atau bahan aktif.

b. Kategori II

Metode analisis yang digunakan untuk penentuan pengotor (*impurities*) atau produk-produk hasil degradasi. Metode ini termasuk analisis kuantitatif dan uji batas.

c. Kategori III

Metode analisis yang digunakan untuk penentuan karakteristik-karakteristik kinerja (misalnya disolusi, pelepasan obat).

d. Kategori IV

Metode analisis untuk pengujian identifikasi.

Metode uji yang berbeda membutuhkan parameter validasi yang berbeda pula seperti pada tabel I (Gandjar dan Rohman, 2007).

Tabel I. Parameter Validasi untuk Masing-masing Tipe Metode Analisis

Parameter Kinerja Analisis	Pengujian Kategori I	Pengujian Kategori II		Uji kategori III
		Kuantitatif	Uji Batas	
Akurasi	Ya	Ya	*	*
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya
Spesifikasi	Ya	Ya	Ya	*
LOD	Tidak	Tidak	Ya	*
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	*
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*
Kisaran (range)	Ya	Ya	*	*
Ketahanan	Ya	Ya	Ya	Ya

*Mungkin dibutuhkan, tergantung pada uji spesifiknya

Parameter validasi metode analisis meliputi:

1) Presisi (ketelitian)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Presisi dapat

dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi tidak lebih atau sama dengan 2% (Harmita, 2004).

Uji presisi (keseksamaan) dilakukan dengan menentukan parameter RSD (*Relative Standard Deviasi*) dengan rumus sebagai berikut (Gandjar dan Rohman, 2007):

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan :

SD = Standar Deviasi

\bar{X} = Kadar rata-rata sampel

2) Akurasi (kecermatan)

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Uji akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standart addition method*). Nilai perolehan kembali yang dapat diterima berdasarkan besarnya konsentrasi analit dapat dilihat pada tabel II (Harmita, 2004).

Tabel II. Nilai Perolehan Kembali Berdasarkan Besarnya Konsentrasi Analit

Analit pada matrik sampel (%)	Rata-rata yang diperoleh (%)
100	98-102
>10	98-102
>1	97-103
>0,1	95-105
0,01	90-107
0,001	90-107
0,0001 (1ppm)	80-110
0,00001 (100 ppb)	80-110
0,000001 (10 ppb)	60-115
0,0000001 (1ppb)	40-120

Menurut International Conference of Harmonization, uji akurasi dilakukan dengan 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Perhitungan perolehan kembali (% *recovery*) dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (WHO, 1992) :

$$\% \text{ recovery} = \frac{A - B}{C} \times 100\%$$

Keterangan :

A= Konsentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan bahan baku

B = Konsentrasi sampel sebelum penambahan bahan baku

C = Konsentrasi bahan baku yang ditambahkan

3) 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. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan. Pada metode

analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya revolusinya (R_s) (Harmita, 2004).

4) Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linieritas biasanya dinyatakan dalam istilah sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $Y = bX + a$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004).

5) Sensitivitas (kepekaan)

Batas deteksi (*LOD/limit of detection*) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Gandjar dan Rohman, 2007). Batas deteksi merupakan parameter uji batas (Harmita, 2004). Cara yang paling umum untuk menghitung LOD adalah menetapkan jumlah sampel yang dapat memberikan perbandingan sinyal terhadap gangguan atau *signal to noise* (S/N) 2:1 atau 3:1, dan yang lebih

sering digunakan adalah 3:1 (Lister, 2005). Definisi LOD yang umum digunakan adalah kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko, Y_B , ditambah simpangan baku blanko (S_B). Jadi, $Y - Y_B = 3S_B$ (Miller dan Miller, 1998).

Batas kuantitasi (*LOQ/limit of quantitation*) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). LOQ seringkali didasarkan pada nilai *signal to noise* (S/N)= 10 (Snyder dkk., 1997). Batas kuantifikasi sering digunakan sebagai batas bawah untuk pengukuran kuantitatif yang tepat. Nilai $Y_B + 10 S_B$ disarankan untuk batas kuantifikasi ini (Miller dan Miller, 1998).

5. Sirup

Sirup adalah sediaan pekat dalam air dari gula atau pengganti gula dengan atau tanpa bahan penambahan bahan pewangi dan zat obat. Sirup merupakan alat yang menyenangkan untuk pemberian suatu bentuk cairan dari suatu obat yang rasanya tidak enak, sirup efektif dalam pemberian obat untuk anak-anak, karena rasanya yang enak biasanya menghilangkan keengganan pada anak-anak untuk meminum obat. Sebagian besar sirup mengandung komponen-komponen berikut disamping air murni dan semua zat-zat obat yang ada diantaranya: gula, biasanya sukrosa atau pengganti gula yang digunakan untuk memberi rasa manis dan kental, pengawet antimikroba, pemberi rasa, dan pewarna (Ansel, 1989).

F. Landasan Teori

Menurut FI edisi V tahun 2014, isoniazid dan pyridoxin dapat ditetapkan kadarnya dengan menggunakan KCKT. Isoniazid dan pyridoxin mengandung unsur elektronegatif yang menjadikan polar sehingga dapat dipisahkan dengan KCKT dan juga memiliki gugus kromofor sehingga dapat dianalisis dengan detektor UV.

Moussa dkk., (2002) telah melakukan monitoring efek terapeutik Isoniazid dengan metode HPLC sederhana dengan deteksi UV. Fase diam yang digunakan C18 dan fase gerak yang digunakan dapar ammonium asetat dan asetonitril (99:1) v/v . Penelitian tersebut memenuhi parameter validasi.

Optimasi dan validasi metode analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet 4 fixed dose combination (4FDC) dan plasma *in vitro* secara KCKT dilakukan oleh Stella (2011). Sistem kromatografi terdiri dari kolom Shimpack C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) untuk dianalisis didalam tablet dan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) untuk dianalisis pada plasma manusia secara *in vitro*. Pada validasi tablet, metode dinyatakan linear dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk INH dan PZA berturut-turut 0,9992 dan 0,9992.

Penelitian yang dilakukan oleh Hidayatullah (2011), yaitu validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan tablet dengan spektrofotometri UV dengan tiga panjang gelombang. Hasil yang diperoleh antara lain terpenuhinya persyaratan parameter validasi kategori I maka metode yang

digunakan pada penelitian tersebut dikatakan valid. Kelemahan dari metode ini adanya komponen yang saling mengganggu dalam penetapan kadarnya.

Lystiani (2015) telah melakukan validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan sirup dengan metode spektrofotometri uv secara simultan. Digunakan perbandingan isoniazid 50 ppm dan pyridoxin HCl 5 ppm (10:1) dalam pelarut air dengan panjang gelombang 262,0 nm dan 285,5 nm. Hasil penelitian disimpulkan bahwa metode Spektrofotometri UV secara simultan untuk penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin HCl dalam sediaan sirup sudah memenuhi persyaratan validasi.

G. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan landasan teori, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut:

1. Validasi metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin menggunakan KCKT dengan fase diam C18 serta fase gerak asetonitril dan dapar fosfat pH 6,0 dapat dilakukan.
2. Validasi pada metode penetapan kadar isoniazid dan pyridoxine HCl menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas.
3. Metode yang sudah divalidasi dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar isoniazid dan pyridoxin dalam sediaan sirup.

