
VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR ISONIAZID DAN VITAMIN B6 MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI SERTA APLIKASINYA DALAM SEDIAAN SIRUP OBAT TUBERKULOSIS

Aqnes Budiarti^{1*}, Nimas Yuniarsh Herdiyanti¹

¹ Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim

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

*Email: aqnesbudiarti@unwahas.ac.id

Abstrak

Isoniazid (INH) dan piridoksin HCl atau vitamin B6 (vit B6) dikenal sebagai obat kombinasi untuk tuberkulosis. Adanya metode penetapan kadar kedua zat ini secara simultan sangat diperlukan dalam uji stabilitas dan studi nasib obat dalam tubuh. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode penetapan kadar INH dan vit B6 menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) serta aplikasinya dalam sediaan sirup tuberkulosis. Pengembangan metode menggunakan KCKT Jasco dengan detektor UV-Vis. Fase diam adalah C₁₈ dan fase gerak berupa campuran dapar fosfat dan asetonitril (75:25, v/v) dengan waktu alir 1,2 mL/menit pada panjang gelombang 280 nm. Selanjutnya dilakukan uji validasi meliputi akurasi, presisi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas. Metode analisis diaplikasikan pada dua sediaan sirup dari pabrik yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode teliti dengan %RSD 0,48 untuk INH dan 0,64% untuk vit B6. Metode akurat dengan % perolehan kembali kedua zat antara 98-102%, metode linier dengan nilai $r = 0,99$ untuk kedua zat. Nilai LoD dan LoQ untuk penetapan kadar INH adalah 2,65 dan 8,85 ppm serta vit B6 adalah 0,33 dan 1,11 ppm. Uji selektifitas menghasilkan nilai resolusi 4,8. Kadar INH dan vit B6 masing-masing dalam sirup adalah 100,26-100,27% dan 100,00-100,85%. Metode analisis yang divalidasi dapat diaplikasikan pada sediaan sirup obat tuberkulosis.

Kata kunci:INH, isoniazid, KCKT, sirup tuberkulosis, vit B6

PENDAHULUAN

Isoniazid (INH) adalah obat tuberkulosis lini pertama yang telah digunakan sejak tahun 1952 karena memiliki efek paling kuat terhadap *M. tuberculosis* (Weisiger, 2007). INH dapat diberikan sebagai terapi tunggal untuk profilaksis maupun sebagai kombinasi dengan obat anti tuberkulosis lain, seperti piridoksin HCl (vit B6).

Validasi metode penetapan kadar INH dan 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 direntang 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 (Setiawati dkk., 1995).

Menurut Farmakope Indonesia Edisi V (2014), INH dapat ditetapkan kadarnya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Fase gerak dibuat dengan melarutkan 4,4 g natrium dokusat dalam 600 ml metanol dan 400 ml air. Vit B6 juga dapat ditetapkan kadarnya menggunakan KCKT. Namun fase gerak berupa campuran 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 menggunakan KCKT dengan deteksi UV. Fase diam yang digunakan C18 dan fase gerak berupa campuran dapar ammonium asetat dan asetonitril (99:1) v/v. Metode tersebut memenuhi parameter validasi.

Stella (2011) telah melakukan optimasi dan validasi metode analisis INH dan pirazinamid dalam tablet 4 *fixed dose combination* (4FDC) dalam plasma in vitro menggunakan KCKT. 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, v/v) untuk analisis tablet dan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1, v/v) untuk analisis pada plasma manusia secara in vitro. Metode analisis dinyatakan linier.

Hidayatullah (2015) melakukan validasi metode penetapan kadar INH dan vit B6 dalam sediaan tablet menggunakan spektrofotometer UV dengan tiga panjang gelombang. Penelitian menghasilkan metode yang valid. Lystiani (2015) juga telah melakukan validasi metode penetapan

kadar INH dan vit B6 dalam sediaan sirup dengan metode spektrofotometri UV secara simultan. Perbandingan INH 50 ppm dan vit B6 5 ppm (10:1) dalam pelarut air pada panjang gelombang 262,0 nm dan 285,5 nm. Dari hasil penelitian Lystiani disimpulkan bahwa metode spektrofotometri UV secara simultan untuk penetapan kadar INH dan vit B6 dalam sediaan sirup memenuhi persyaratan validasi.

Kegiatan validasi metode analisis untuk produk farmasi harus dilakukan mulai dari industri farmasi 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 yang diinginkan sesuai dengan spesifikasi dapat dipercaya secara ilmiah. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai validasi metode penetapan kadar INH dan vit B6 menggunakan KCKT dan aplikasinya dalam sediaan sirup.

METODE PENELITIAN

Bahan

Baku pembanding isoniazid (INH), vitamin B6, sirup A dan B yang berasal dari pabrik yang berbeda, asetonitril, dapar fosfat pH 6,0, asam asetat glasial P

Alat

Seperangkat KCKT (Jazco) terdiri dari pompa (PU 2080 plus), kolom C18 Lichrosper 100, Rp-18 (100 mm x 4,6 mm ID, 5 μ m), detektor UV (2070 plus) dan pengolah data pada komputer (EZchrom elite), spektrofotometer UV-Vis (1800 shimadzu), pH meter (Handylab), timbangan analitik (Ohaus), membran penyaring nylon 0,45 μ m (GVS), membran penyaring nitro selulosa 0,45 μ m (Merck), digital Ultrasonic Cleaner (Jeken), mikropipet (Soccorex).

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Larutan Baku INH dan Vit B6

a. Pembuatan Larutan Baku INH

INH ditimbang seksama sebanyak 10 mg, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan dengan aquadest, kemudian ditambahkan aquadest sampai garis tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 μ g/mL. Larutan disonifikasi selama 5 menit dan disaring dengan membran penyaring nylon 0,45 μ m.

b. Pembuatan Larutan Baku Vit B6

Vit B6 ditimbang seksama sebanyak 10 mg, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan dengan aquadest, kemudian ditambahkan aquadest sampai garis tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 μ g/mL. Larutan disonifikasi selama 5 menit dan disaring dengan membran penyaring nylon 0,45 μ m.

2. Pembuatan Dapar Fosfat pH 6,0

Kalium dihidrogen fosfat 1,6 gram dan 0,3 gram dipotassium hidrogen fosfat dilarutkan ke dalam 100 ml air. Setelah larutan dingin, ditambah asam asetat glasial sampai pH 6,0 (Raja dan Rao, 2013).

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Larutan INH dan vit B6 berkonsentrasi 20 μ g/ml dalam fase gerak dapar fosfat : asetonitril (75:25 v/v) masing-masing *discanning* pada panjang gelombang 200-400 nm. Selanjutnya ditentukan panjang gelombang maksimal berupa titik isobatik.

4. Optimasi Komposisi Fase Gerak

Optimasi fase gerak terdiri dari campuran dapar fosfat dan asetonitril dengan perbandingan 90:10; 85:15 dan 75:25 v/v. Selanjutnya dipilih fase gerak yang memberikan data terbaik. Laju alir yang digunakan adalah 1,2 mL/ menit.

5. Pembuatan Kurva Baku INH dan Vit B6

Larutan stok baku INH 1000 μ g/mL dipipet 50, 100, 150, 200, 250, 300 μ L dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL. Sedangkan larutan stok vit B6 dipipet 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ L dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL. Masing-masing labu takar ditambah fase gerak dengan komposisi hasil optimasi sampai tanda batas dan kocok hingga homogen sehingga diperoleh konsentrasi INH 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ g/mL dan konsentrasi vit B6 2, 4,6, 8, 10, 12 μ g/mL.

Kemudian masing-masing larutan disaring dengan membran penyaring *nylon* 0,45 μm dan diinjeksikan ke sistem KCKT dengan volume penyuntikan 20 μL dan dideteksi pada panjang gelombang 280 nm dengan laju alir 1,2 mL/menit. Hasil yang diperoleh dari kromatogram dibuat kurva baku kemudian dihitung persamaan regresi linier dan faktor korelasinya.

6. Validasi

a. Uji Presisi

Larutan standar baku yang mengandung INH 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan vit B6 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diinjeksikan sebanyak 20 μL ke alat KCKT pada kondisi optimum. Luas area, waktu retensi, tinggi puncak INH dan vit B6 dicatat. Percobaan direplikasi sebanyak 6 kali untuk masing-masing konsentrasi. Selanjutnya dihitung persentase koefisien variasinya (%RSD).

b. Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku (*standard addition method*) melalui uji perolehan kembali pada sampel yang ditambah baku pada konsentrasi 80, 100 dan 120% dari INH dan vit B6 dalam sirup. Replikasi dilakukan masing-masing sebanyak 3 kali. Perolehan kembali dihitung dengan membandingkan jumlah INH dan vit B6 terukur untuk penambahan baku terhadap kadar INH dan vit B6 yang ditambahkan dengan rumus (Snyder dkk., 1997).

c. Uji Selektivitas

Berdasarkan kromatogram dapat dilihat apakah puncak analit INH dan vit B6 dan komponen lain dalam sirup terpisah sempurna.

d. Uji Linieritas

Larutan stok campuran INH dan vit B6 dengan seri konsentrasi sesuai kurva baku diinjeksikan masing-masing sebanyak 20 μL ke dalam alat KCKT. Persamaan regresi linier dibuat berdasarkan luas area kromatogram masing-masing dan ditentukan koefisien relasinya. Uji linearitas dilakukan tiga kali pengulangan. Persamaan regresi terbaik merupakan persamaan kurva baku untuk menetapkan kadar sampel.

e. Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas meliputi uji batas deteksi (LoD) dan uji batas kuantifikasi (LoQ). Batas deteksi dan batas kuantifikasi dihitung secara statistik menggunakan persamaan garis regresi linier yang diperoleh dari uji linieritas (Miller dan Miller, 1988).

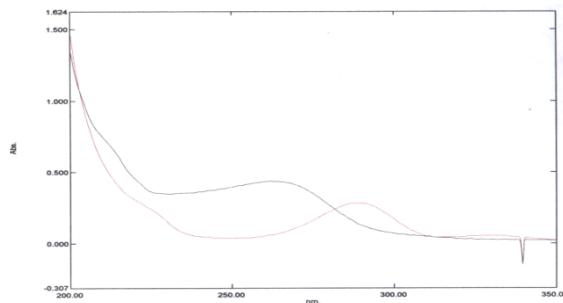
7. Penetapan Kadar INH dan Vit B6 dalam Sediaan Sirup

Sampel sirup dipipet 1 mL setara dengan 20 mg INH dan 2 mg vit B6. Sampel dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL, dilarutkan dengan fase gerak sampai tanda. Kemudian larutan disonikasi selama 10 menit. Larutan sampel INH dan vit B6 disaring dengan *nylon* 0,45 μm dengan bantuan pompa vakum kemudian diinjeksikan sebanyak 20 μL ke sistem KCKT dan di deteksi pada panjang gelombang 280 nm dengan laju alir 1,2 mL/menit kemudian dihitung kadarnya. Larutan dipipet 1 mL, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, diencerkan dengan fase gerak sampai garis tanda. Larutan disonikasi selama 2 menit dan disaring dengan membran *nylon*, kemudian diinjeksikan sebanyak 20 μL ke sistem KCKT dan dideteksi pada panjang gelombang 280 nm dengan laju alir 1,2 mL/menit. Kemudian dihitung kadarnya. Kadar INH dan vit B6 dalam sampel dapat dihitung dengan mensubtitusikan luas area sampel pada Y dari persamaan regresi : $Y=bx+a$. Penetapan kadar dilakukan replikasi 6 kali. Perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap sampel B

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penentuan Panjang Gelombang untuk Analisis

Penentuan panjang gelombang INH dan vit B6 dilakukan menggunakan spektrofotometri UV pada rentang 200-400 nm. Kompantseva dkk., (2005) pada penelitiannya menyebutkan bahwa panjang gelombang untuk analisis granul INH dan vit B6 adalah 280 nm. Hasil *scanning* masing-masing larutan INH dan vit B6 menghasilkan panjang gelombang INH 263,9 nm dan 289,7 nm dan didapatkan potongan titik isobatik pada 280 nm, dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil Scanning Penentuan Panjang Gelombang

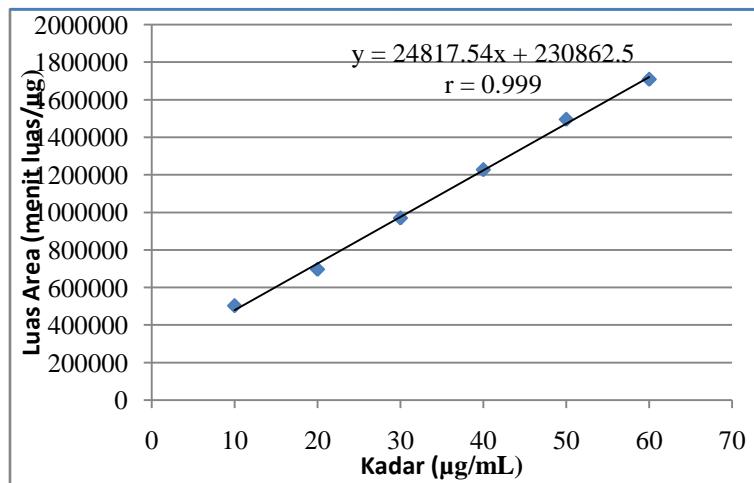
Optimasi Komposisi Fase Gerak

Optimasi komposisi fase gerak dapat dilihat dari waktu retensi, resolusi (keterpisahan) serta luas puncak masing-masing analit. Resolusi menandakan polaritas keseluruhan pelarut yang dapat memisahkan puncak analit secara sempurna sehingga tidak merusak hasil analisis. Resolusi dipengaruhi oleh faktor selektivitas, selain faktor kapasitas dan nilai plat teori. Salah satu cara untuk mencapai selektivitas yang diharapkan yaitu dengan merubah jenis pelarut yang digunakan untuk fase gerak (Snyder dkk., 1997)

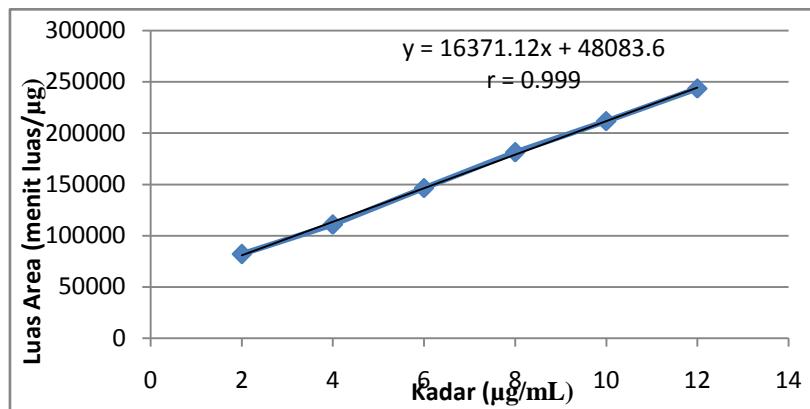
Optimasi fase gerak dilakukan dengan cara merubah perbandingan fase gerak sehingga ditemukan komposisi fase gerak yang tepat. Fase gerak dengan perbandingan diper fosfat : asetonitril (75:25, v/v) menghasilkan waktu retensi yang relatif cepat, luas puncak relatif sempit dan peak yang dihasilkan simetris, sehingga fase gerak dengan perbandingan diper fosfat : asetonitril (75:25 v/v) dipilih sebagai komposisi fase gerak yang optimum dan komposisi ini dipilih untuk analisis zat.

Pembuatan Kurva Baku

Pembuatan kurva baku menghasilkan persamaan garis untuk INH adalah $Y = 24817,54x + 230862,5$ dan untuk vit B6 adalah $Y = 16371,12X + 48083,6$ dengan koefisien korelasi $r = 0,999$ untuk INH dan vit B6.



Gambar 1. Kurva Baku INH



Gambar 2. Kurva Baku Vit B6

Validasi Metode Analisis

1. Presisi (ketelitian)

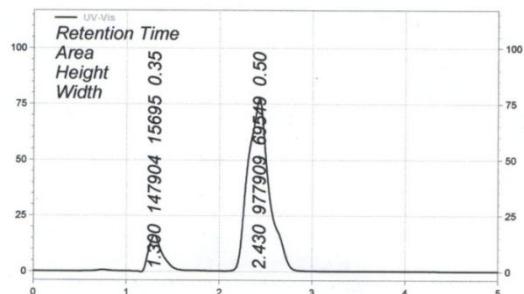
Presisi merupakan parameter yang menyatakan metode uji dapat dilakukan secara berulang-ulang dalam satu seri pengukuran dan akan selalu menghasilkan kadar yang mendekati sama atau sama. Uji presisi ditentukan berdasarkan nilai %RSD waktu retensi, luas puncak dan tinggi puncak kromatogram. Metode analisis yang divalidasi memiliki presisi yang baik karena nilai RSD kurang dari 2% (Harmita, 2004).

2. Akurasi (ketepatan)

Uji akurasi suatu analisis menunjukkan kedekatan hasil penetapan kadar dengan kadar yang sebenarnya. Uji ketepatan dilakukan dengan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*) pada konsentrasi 80, 100 dan 120% dari kadar analit. Penambahan bahan baku INH dan vit B6 80% dari kadar analit menghasilkan rentang perolehan kembali masing-masing adalah 99,73–100,47% dan 100,07–100,38%. Bahan baku INH dan vit B6 yang ditambahkan setara dengan 100% dari kadar analit target menghasilkan rentang perolehan kembali untuk INH adalah 100,12–100,63% dan untuk vit B6 adalah 99,96–100,29%. Penambahan baku INH dan vit B6 yang setara 120% dari kadar analit target menghasilkan rentang perolehan kembali untuk INH adalah 99,84–100,54% dan untuk vit B6 adalah 100,03–100,21%.

3. Selektivitas

Selektivitas ditentukan melalui nilai resolusinya (R). Berdasarkan kromatogram dapat dilihat puncak analit INH dan vit B6 serta komponen lain dapat terpisah sempurna menghasilkan nilai R = 4,8 yang memenuhi persyaratan pemisahan yang baik, R ≥ 2,00 (Snyder dkk., 1997). Nilai resolusi yang semakin besar menunjukkan pemisahan komponen-komponen dalam sirup yang terelusi dengan waktu retensi yang berdekatan semakin efisien. Hasil pemisahan dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kromatogram Vit B6 dan INH dalam Sediaan Sirup.

4. Linieritas

Penetapan uji linearitas didasarkan pada hubungan linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram. persamaan garis untuk INH adalah $Y = 24817,54x + 230862,5$ dan untuk vit B6 adalah $Y = 16371,12X + 48083,6$ dengan koefisien korelasi $r = 0,999$ untuk INH dan vit

- B6. Persamaan garis selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar INH dan vit B6 masing-masing pada sirup A dan B .
5. Sensitivitas

Sensitivitas metode analisis dinyatakan dengan nilai LoD dan LoQ. Semakin kecil nilainya maka semakin sensitif suatu metode analisis. Berdasarkan perhitungan dari kurva baku, diperoleh nilai LoD dan LoQ pada INH dan vit B6 masing-masing yaitu sebesar 1,11 μ g/mL; 8,85 μ g/mL dan 0,33 μ g/mL; 2,66 μ g/mL.

Penetapan Kadar INH dan Vitamin B6

Penetapan kadar INH dan vit B6 dalam sediaan sirup dihitung dengan cara memplotkan luas area (Y) sampel dengan masing-masing kurva baku. Hasil perhitungan dari kadar INH dan vit B6 dalam sediaan sirup dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Hasil Uji Penetapan Kadar INH dan Vit B6 dalam Sediaan Sirup

Sampel	Luas Puncak		Kandungan %		Rata-rata		SD		% RSD	
	Vit B6	INH	Vit B6	INH	Vit B6	INH	Vit B6	INH	Vit B6	INH
A	1	113710	1225784	100.22	100.22					
	2	113960	1227379	100.60	100.38					
	3	113865	1221452	100.45	99.79	100,27	100,00	0,23	0,25	0,00
	4	113551	1222645	99.97	99.91					
	5	113755	1221245	100.28	99.77					
	6	113640	1222900	100.11	99.93					
B	1	113532	1224718	99.94	100.12					
	2	113453	1225032	99.82	100.15					
	3	113906	1227599	100.52	100.41	100,27	100,08	0,33	0,19	0,00
	4	113840	1222988	100.41	99.94					
	5	114004	1224118	100.67	100.06					
	6	113732	1221976	100.25	99.84					

Berdasarkan tabel I, hasil dinyatakan memenuhi persyaratan yang tertera pada Farmakope Indonesia Edisi V (2014), yaitu INH dan vit B6 masing-masing mengandung tidak kurang dari 98,00% dan tidak lebih dari 102% dari jumlah yang tertera pada etiket terhitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

KESIMPULAN

1. Validasi metode penetapan kadar INH dan vit B6 dapat dilakukan menggunakan metode KCKT dengan fase diam C₁₈ dan fase gerak terdiri dari campuran dapar fosfat : asetonitril (75:25, v/v) dengan laju alir 1,2 mL/menit pada panjang gelombang 280 nm dan volume injeksi 20 μ L.
2. Uji validasi metode penetapan kadar INH dan vit B6 memenuhi persyaratan validasi.
3. Metode analisis yang tervalidasi dapat diaplikasikan pada penetapan kadar zat aktif INH dan vit B6 dalam sediaan sirup dan memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan Farmakope Indonesia Edisi V (2014).

DAFTAR PUSTAKA

- Setiawati, A., Zunilda SB., Suyatna, (1995), *Pengantar Farmakologi dalam: Farmakologi dan Terapi*, Jakarta, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Hal : 1-14.
- Depkes RI., (2014), *Farmakope Indonesia*, Edisi V, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Harmita, (2004), Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian.*, 1, No.3,117-135.
- Hidayatullah, M.N., (2015), Validasi Metode Penetapan Kadar INH dan Vit B6 dalam Sediaan Tablet Dengan Spektrofotometri Cara Tiga Panjang Gelombang, *Skripsi*, Universitas Airlangga, Surabaya.

-
- Kompantseva, E.V., Khalata, Ovcharenko, Dukkardt and Blagorazumnaya, (2005), HPLC Analysis of A New Granulated Preparation Containing INH and Pyridoxine Hydrochloride, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **39**, 8
- Listyani, P., (2015), Validasi Metode Penetapan Kadar INH dan Piridoksin HCl Dalam Sediaan Sirup Dengan Metode Spektrofotometri UV Cara Simultan, *Skripsi*, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Miller, J.C., and Miller, J.N., (1988), *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York.
- Moussa, L.A., Khassouani, C.E., Soulaymani, R., Jana, M., Cassans, G., Alric, R., Hue, B., (2002), Therapeutic INH Monitoring Using a Simple High-Performance Liquid Chromatographic Method with Ultraviolet Detection, *Journal Of Chromatographic Science*.
- Stella, (2011), Optimasi dan Validasi Metode Analisis INH dan Pirazinamid Dalam Tablet 4 Fixed Dose Combination (4FDC) dan Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, *Skripsi*, Universitas Indonesia, Depok.
- Weisiger, R. A., (2007), INH hepatotoxicity, *Emedicine*, **21**, 1-10.