

**PENGUKURAN KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN
TBC DI BEBERAPA PUSKESMAS KABUPATEN X**



Oleh:

**Nadia Firdausi
19133963A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**PENGUKURAN KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN
TBC DI BEBERAPA PUSKESMAS KABUPATEN X**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*



Oleh:

**Nadia Firdausi
19133963A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul

**PENGUKURAN KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN
TBC DI BEBERAPA PUSKESMAS KABUPATEN X**

Oleh :
Nadia Firdausi
19133963A

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 14 Agustus 2017

Mengetahui ,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

(Prof. Dr. R. A. Oetari. SU.,MM.,M.Sc.,Apt)

Pembimbing,

Lucia Vita Inandha Dewi, S.Si, M.Sc.,Apt

Pembimbing pendamping,

Iswandi, S.Si, M.Pharm.,Apt

Penguji :

1. Dr. Gunawan Pamuji W, S.Si., M.Si., Apt
2. Endang Sri Rejeki, S.Si., M.Si., Apt
3. Opstaria Saptarini, S.Farm., M.Si., Apt
4. Lucia Vita Inandha Dewi, S.Si., M.Si., Apt

1.

3.

2.

4.

PERNYATAAN

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

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 14 Agustus 2017



Nadia Firdausi

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrohmaanirrohiim

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”

(Q.S. Al-Insyiroh: 5-8)

“Man jadda wa jada, siapa yang bersungguh-sungguh akan berhasil.

Man shobaro zhafiro, siapa yang bersabar akan beruntung.

Man saro darbi ala washola, siapa yang berjalan di jalanNYa akan sampai”

“Berkah dulu, bahagia kemudian”

(Nadia Firdausi)

Karya ini aku persembahkan untuk:

- ❖ Allah Subhanahu Wa Ta'ala, Rabbku yang dengan mengingatnya membuatku tenang dan atas ridhoNya aku bisa hidup baik.
- ❖ Muhammad SAW, nabi dan rosulku yang telah memberi uswah hasanah dalam kehidupan ini.
- ❖ Abi Aris dan Umi Atik, kedua orang tuaku yang telah mencintaiku tanpa syarat sejak aku ada di dunia ini serta mendoakanku dimanapun dan kapanpun.
- ❖ Kakak-kakakku, adik-adikku, keponakanku, dan kakek nenekku yang tersayang.
- ❖ Islam, agamaku yang Rohmatan lil 'alamiin.
- ❖ Indonesia, negaraku yang amat membanggakan.
- ❖ Serta 'keluarga islami'ku kelak yang masih Allah simpankan rahasiaNya

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“PENGUKURAN KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN TBC DI BEBERAPA PUSKESMAS KABUPATEN X”** Penyusunan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Banyak hal yang penulis dapatkan dalam proses pembuatan skripsi ini baik berupa bimbingan, petunjuk dan saran-saran yang berguna dari berbagai pihak, maka pada kesempatan ini dengan tulus penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU.,MM., M.Sc.,Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Lucia Vita Inandha Dewi, S.Si, M.Sc, Apt. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, perhatian dan keikhlasannya dalam memberikan ilmu dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Iswandi, S.Si, M.Pharm, Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah banyak membantu dalam memberikan masukan dan bimbingan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Tim penguji yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk penyempurnaan skripsi ini.
6. Dosen, asisten dosen dan staff laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta untuk bantuan dan kerjasamanya.
7. Abi Aris Surawan Giriyanto dan Umi Marijati yang tak pernah berhenti mendo'akan dan memberikan dukungan moril maupun materi.
8. Mbak Yayang, Mas Acep, Dek Fira, Dek Fursan, dan Azki yang telah mendo'akan dan menjadi penyemangat yang hangat.

9. Untuk sahabat-sahabat FOSMI 2013 “Solchan Solgan”, Nofika; Puti; Erni; Opik; Nadha; Lu’lu dan Nur terima kasih canda tawa, semangat dan dukungan yang kalian berikan.
10. Untuk guru dan teman-teman ngajiku yang membuatku selalu ingat ‘Tidak ada kata berhenti untuk berdakwah’.
11. Teman-teman seperjuangan “Pejuang Skripsi”, Jen; Dewi dan Afifah yang banyak membantu dalam penyelesaian penelitian ini, *see you on top!*.
12. Keluarga besar Forum Silaturahmi Mahasiswa Islam (FOSMI) USB, Puskomda Solo Raya, dan Garuda Keadilan Sragen yang dengan bersama mereka membuatku merasa jalan menuju syurga Firdaus terasa lebih menyenangkan.
13. Untuk teman-teman S1 Farmasi yang banyak membantu dan menghibur selama 4 tahun berkuliah, Tince, Widuri, Risma, Lutfi, Wisnu, dll. serta kakak-kakak tingkat yang baik Mbak Kurnia, Mbak Astiti, dan Mas Rio.
14. Untuk adek-adek binaanku di USB, Stikes Kusuma Husada dan Remaja Masjid Baiturahman Sekip.
15. Semua pihak yang telah membantu sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan kelemahan karena keterbatasan penulis untuk itu kritik dan saran dari pembaca sangat penulis harapkan dalam penyempurnaan penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca untuk perkembangan dunia farmasi yang lebih baik. Aamiin.

Wassalamu’alaikum Wr.Wb

Surakarta, 14 Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tuberkulosis	5
1. Epidemiologi	5
2. Definisi	5
3. Klasifikasi.....	6
4. Cara penularan.....	7
5. Gejala.....	7
6. Diagnosis	7
7. Pengobatan	9
8. Evaluasi	10
9. Program DOTS	11
B. Isoniazid	11
1. Struktur kimia.....	12
2. Pemerian dan kelarutan	12
3. Kegunaan.....	12
4. Efek samping.....	12
5. Mekanisme kerja	12
6. Farmakokinetik.....	13

7. Interaksi	14
C. Plasma dan Darah.....	14
D. Kadar Obat dalam Plasma.....	14
1. Arti penting kadar obat dalam plasma.....	14
2. Penetapan kadar obat dalam darah	15
3. Interpretasi klinik terhadap kadar obat dalam darah	16
E. Farmakokinetika.....	16
1. Pengertian farmakokinetika.....	16
2. Profil farmakokinetika.....	16
3. Parameter farmakokinetika.....	17
4. Model kompartemen.....	18
F. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	20
1. Definisi KCKT	20
2. Keuntungan KCKT.....	21
3. Instrumentasi KCKT	21
4. Sistem pemisahan KCKT	23
5. Pengukuran kinerja Kolom.....	24
6. Analisis dalam KCKT	25
7. Validasi.....	26
G. Landasan Teori.....	29
H. Hipotesis.....	30
BAB III. METODE PENELITIAN.....	31
A. Rancangan Penelitian	31
B. Waktu dan Tempat Penelitian	31
C. Populasi dan Sampel	31
1. Kriteria inklusi.....	31
2. Kriteria eksklusi.....	32
D. Variabel Penelitian	32
1. Identifikasi variabel utama	32
2. Klasifikasi variabel utama	32
3. Definisi Operasional Variabel Utama	33
E. Alat dan Bahan	33
1. Alat	33
2. Bahan.....	33
F. Jalannya Penelitian.....	35
1. Pengumpulan data pasien	35
2. Penetapan panjang gelombang optimum analisis.....	35
3. Pembuatan fase gerak	35
4. Optimasi kondisi analisis INH.....	35
5. Preparasi larutan baku INH dalam plasma darah plasebo	36
6. Validasi metode analisis INH.....	36
7. Pengukuran kadar INH dalam plasma darah plasebo (<i>in vitro</i>).....	37
8. Pengambilan Sampel Darah Pasien TBC	38

9. Pengukuran kadar INH dalam plasma darah pasien TBC (<i>in vivo</i>).....	38
10. Analisis Data	38
G. Skema Jalannya Penelitian	39
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	40
1. Pengambilan sampel darah.....	40
2. Penetapan panjang gelombang analisis	40
3. Optimasi kondisi analisis INH	40
4. Preparasi larutan baku INH dalam plasma darah plasebo.....	42
5. Validasi metode analisis INH	43
6. Pengukuran kadar INH dalam plasma darah plasebo (<i>in vitro</i>)	46
7. Pengukuran kadar INH dalam plasma darah pasien TBC (<i>in vivo</i>).....	46
8. Pengaruh rifampisin dalam pengukuran kadar inh dalam plasma darah pasien tuberkulosis	49
9. Gambaran evaluasi <i>outcome</i> klinis pasien tuberkulosis.....	50
10. Analisis data	52
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
A. Kesimpulan	53
B. Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur Kimia Isoniazid	12
Gambar 2. Skema Jalannya Penelitian	39
Gambar 3. Kurva Kalibrasi Isoniazid.....	43

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Pemilihan Perbandingan Komponen Fase Gerak	40
Tabel 2. Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak	41
Tabel 3. Pemilihan Molaritas Kalium Dihidrogen Fosfat	42
Tabel 4. Uji Akurasi dan Perolehan Kembali	44
Tabel 5. Uji Presisi	45
Tabel 6. Kadar <i>In Vitro</i> INH dalam Plasma Plasebo	46
Tabel 7. Kadar <i>In Vivo</i> INH dalam Plasma Pasien TBC.....	47
Tabel 8. Evaluasi <i>Outcome</i> Klinis Pasien Tuberkulosis	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Uji Kelaikan Etik	60
Lampiran 2. Surat Baku Isoniazid.....	61
Lampiran 3. Surat Baku Rifampisin.....	62
Lampiran 4. Bahan dan Alat.....	63
Lampiran 5. Gambar.....	68
Lampiran 6. Tabel dan Perhitungan.....	89
Lampiran 7. Rumus-rumus.....	101
Lampiran 8. Singkatan.....	103

INTISARI

FIRDAUSI, N., 2017, PENGUKURAN KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN TBC DI BEBERAPA PUSKESMAS KABUPATEN X, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Isoniazid adalah obat tuberkulosis yang paling poten dalam hal membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Terapi dengan INH selama 6-12 bulan digunakan sebagai rejimen standar dalam pengobatan tuberkulosis. Penggunaan yang lama dapat menimbulkan resistensi bakteri terhadap INH, sehingga penanganan tuberkulosis semakin sulit. Isoniazid secara *in vivo* akan mencapai kadar plasma puncak dalam 1-2 jam sesudah pemberian dosis peroral 300 mg menghasilkan konsentrasi plasma puncak 3-5 µg/ml. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur kadar Isoniazid dalam plasma darah pasien tuberkulosis di beberapa Puskesmas di Kabupaten X.

Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi(KCKT) metode fase terbalik menggunakan kolom Shimpack C₁₈ dan sistem elusi isokratik, fase gerak yang digunakan Kalium Dihidrogen Fosfat 15 mmol pH 6,2-asetonitril (99:1) dengan laju alir 1,0 ml/menit. Larutan baku INH dideteksi pada panjang gelombang 230 nm.

Hasil pengukuran Kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis setelah 2 jam minum obat adalah tidak semua sampel mencapai kadar puncak yang dibutuhkan berdasar teori, dengan rata-rata kadar INH dalam plasma darah pasien TBC adalah 6,221 µg/ml. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara kadar INH target dengan kadar INH terukur pada plasma pasien TBC.

Kata kunci: Isoniazid, Plasma, Tuberkulosis, KCKT

ABSTRACT

FIRDAUSI, N., 2017, MEASUREMENT OF ISONIAZID LEVELS IN BLOOD PLASMA ON THE EFICATION OF TBC PATIENS IN SOME OF PUSKEMAS X CITY, ESSAY, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Isoniazid is the most potent tuberculosis drug in terms of killing the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. Treatment with INH for 6-12 months was used as a standard regimen in the treatment of tuberculosis. Prolonged use may lead to bacterial resistance to INH, making handling of tuberculosis more difficult. Isoniazid in vivo will reach peak plasma levels within 1-2 hours after administering 300 mg peroral doses resulting in peak plasma concentrations of 3-5 µg / ml. This study aims to measure Isoniazid levels in blood plasma of tuberculosis patients in some Puskesmas in Kabupaten X.

In this research, measurement levels of INH in blood plasma tuberculosis patients by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method using a reversed phase Shimpack C₁₈ column and an isocratic solvent programme, mobile phase was the mixture of Kalium Dihidrogen Fosfat 15 mmol pH 6,2 : acetonitril (99:1) with a flow rate 1,0 ml/min and measurement were done at a wavelength of 230 nm.

The measurement of INH levels in the blood plasma of tuberculosis patients after 2 hours of taking the drug was that not all samples reached the required peak level by theory, with mean INH levels in blood plasma of TB patients was 6,221 µg / ml. The results of statistical analysis showed that there was a difference between target INH levels and measured INH levels in plasma of TB patients.

Keywords: Isoniazid, Plasma, Tuberculosis, HPLC

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tuberkulosis (TB) paru merupakan salah satu penyakit menular yang menyerang organ paru-paru. TB paru diperkirakan sudah ada di dunia sejak 5000 tahun sebelum masehi. Kemajuan dalam penemuan dan pengendalian penyakit TB Paru sudah ada sejak 2 abad terakhir (Kemenkes 2015). Walaupun demikian, sebagian besar negara-negara di dunia belum berhasil mengendalikan penyakit TB paru. Angka kesakitan dan kematian akibat penyakit TB paru cenderung menetap dan meningkat (Widoyono 2011).

Dengan berbagai upaya pengendalian yang dilakukan, insiden dan kematian akibat tuberkulosis telah menurun, namun tuberkulosis diperkirakan masih menyerang 9,6 juta orang dan menyebabkan 1,2 juta kematian pada tahun 2014. India, Indonesia dan China merupakan negara dengan penderita tuberkulosis terbanyak yaitu berturut-turut 23%, 10% dan 10% dari seluruh penderita di dunia (WHO 2015).

Penemuan kasus TB BTA Positif pada di Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta tahun 2015 sebesar 66,80% naik dibandingkan Tahun 2014 yang dilaporkan sebesar 44,19%. Jumlah kematian akibat TB dilaporkan sejumlah 11 orang. Angka kesuksesan (*Succes Rate*) terdiri dari angka kesembuhan dan pengobatan lengkap TB Paru. Angka kesuksesan pada tahun 2015 dilaporkan sebesar 95,09%. Angka kesembuhan (*Cure rate*) pada tahun 2014 dilaporkan sebesar 63,39%. Angka kesembuhan pengobatan TB di Kabupaten Bantul pada tahun 2015 turun bila dibandingkan dengan tahun 2014 sebesar 82,19 dan angka kesembuhan ini juga berada di bawah target Nasional (85%) (Dinkes Bantul 2016).

Pengobatan tuberkulosis bertujuan untuk menyembuhkan pasien, mencegah kematian, mencegah kekambuhan, memutuskan rantai penularan dan mencegah terjadinya resistensi kuman terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT)

(Kemenkes 2011b). Obat yang umum dipakai adalah Isoniazid, Etambutol, Rifampisin, Pirazinamid, dan Streptomisin. Kelompok obat ini disebut sebagai obat primer. Isoniazid adalah obat TB yang paling poten dalam hal membunuh bakteri dibandingkan dengan streptomisin dan rifampisin (Depkes 2005). Terapi infeksi laten TB dengan isoniazid (INH) akan mengurangi kejadian perkembangan infeksi TB menjadi aktif dan menurunkan jumlah orang dewasa yang akan menularkan pada orang lain (PTCG 2004).

Terapi dengan INH selama 6-12 bulan telah lama digunakan sebagai rejimen standar dalam mengatasi infeksi laten TB. (Comstock 1999). Munculnya resistensi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap rifampisin dan isoniazid, yang selanjutnya disebut dengan MDRTb (Multidrug Resistance Tuberculosis), menyebabkan penanganan tuberkulosis semakin sulit (Novizar *et al.* 2010). Penderita yang meminum obat secara tidak teratur atau tidak selesai, justru akan mengakibatkan terjadinya kekebalan ganda kuman tuberkulosis paru terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) (Yeti *et al* 2015).

Dalam Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI Tuberkulosis (2015), Tinggi-rendahnya TSR (*Treatment Success Rate*) dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain faktor pasien, faktor Pengawas Menelan Obat (PMO), dan faktor obat. Lebih khususnya dalam Mansyur *et al.* (2001), dinyatakan bahwa kasus TB meningkat disebabkan tingginya angka resistensi terhadap obat TB. Resistensi ini disebabkan antara lain karena pemakaian obat anti-tuberkulosis (OAT) tunggal, kombinasi OAT yang tidak memadai dan pemakaian OAT yang tidak teratur.

Ritschel & Kearns (2009) menyatakan bahwa kadar obat plasma (Cp) sangat tergantung dengan dosis obat yang diberikan. Dalam Nijland *et al.* (2006), bahwa konsentrasi OAT plasma yang rendah berhubungan dengan gagal pengobatan dan resistensi obat pada tuberkulosis. Peningkatan dosis akan diikuti dengan peningkatan konsentrasi rifampisin dalam plasma di atas konsentrasi hambat minimal (MIC) *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menginduksi lebih cepat efek bakterisida terhadap *M.tb* dan diindikasikan dengan *outcome* klinis (konversi dahak) (Sampurno 2015). Isoniazid secara *in vitro* memiliki kadar

hambat minimum sekitar 0,025-0,05 µg/mL (Istiantoro dan Setiabudy 2007, diacu dalam Stella 2011). Isoniazid secara *in vivo* akan mencapai kadar plasma puncak dalam 1-2 jam sesudah pemberian dosis peroral 300 mg menghasilkan konsentrasi plasma puncak 3-5 µg/ml (Katzung 2005, diacu dalam Stella 2011). Dalam Moussa *et al.* (2016) menyatakan, bahwa kadar INH yang tinggi pada pasien dengan ADR dan tanpa ADR sering terjadi. Selaras dengan hal tersebut, dalam Fentimalia (2010) didapatkan hasil pengukuran kadar INH 2 jam setelah minum obat dalam plasma pasien TBC menggunakan KCKT sebesar 6,9 µg/ml.

Objek dalam penelitian ini adalah pasien tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut di beberapa Puskesmas Kabupaten X. Dalam Stella (2011), Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang sederhana dan reproduibel digunakan untuk pengukuran kadar INH secara simultan dalam plasma manusia. Larutan dideteksi pada panjang gelombang 242 nm dan laju alir 1,0 mL/menit dengan fase terbalik menggunakan kolom C₁₈, fase gerak yang digunakan campuran kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2-asetonitril perbandingan 99:1. Analisis data menggunakan SPSS *Statistics* 17.0 dengan *One Sample t-test* untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar puncak INH setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori dengan kadar terukur dalam plasma darah pasien tuberkulosis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengukur kadar Isoniazid dalam plasma darah pasien tuberkulosis di beberapa Puskesmas di Kabupaten X menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

B. Perumusan Masalah

Dari uraian tersebut dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis sudah mencapai kadar puncak setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori ?
2. Apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar puncak INH setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori dengan kadar INH terukur dalam plasma darah pasien tuberkulosis?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis sudah mencapai kadar puncak setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori.
2. Mengetahui tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar puncak INH setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori dengan kadar INH terukur dalam plasma darah pasien tuberkulosis.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi mahasiswa dan masyarakat pada umumnya dan dalam pengembangan ilmu kefarmasian tentang pengukuran kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis serta dapat digunakan sebagai uji pendahuluan untuk kepentingan pemantauan terapi obat dalam darah pasien yang berpenyakit TBC guna membantu dalam penyesuaian dosis obat sehingga diperoleh pengobatan yang optimal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tuberkulosis

1. Epidemiologi

Tuberkulosis (TB) paru yaitu salah satu penyakit menular yang menyerang organ paru-paru. TB paru diperkirakan sudah ada di dunia sejak 5000 tahun sebelum masehi. Kemajuan dalam penemuan dan pengendalian penyakit TB Paru sudah ada sejak 2 abad terakhir (Kemenkes 2015). Walaupun demikian, sebagian besar negara-negara di dunia belum berhasil mengendalikan penyakit TB paru. Angka kesakitan dan kematian akibat penyakit TB paru cenderung menetap dan meningkat (Widoyono 2011). Dengan berbagai upaya pengendalian yang dilakukan, insiden dan kematian akibat tuberkulosis telah menurun, namun tuberkulosis diperkirakan masih menyerang 9,6 juta orang dan menyebabkan 1,2 juta kematian pada tahun 2014. India, Indonesia dan China merupakan negara dengan penderita tuberkulosis terbanyak yaitu berturut-turut 23%, 10% dan 10% dari seluruh penderita di dunia (WHO 2015).

2. Definisi

Tuberkulosis (TB) adalah suatu penyakit infeksi menular yang disebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menyerang berbagai organ, terutama paru-paru. Penyakit ini bila tidak diobati atau pengobatannya tidak tuntas dapat menimbulkan komplikasi berbahaya hingga kematian (Kemenkes 2015).

Mycobacterium tuberculosis menyebabkan TB dan merupakan patogen manusia yang sangat penting (Jawets *et al.* 2008). Kuman ini non motil, non spora, dan tidak berkapsul (Palomina *et al.* 2007). Sebagian besar dinding kuman terdiri atas lipid, kemudian peptidoglikan dan arabinomannan. Lipid inilah yang membuat kuman lebih tahan terhadap asam (asam alkohol) sehingga disebut bakteri tahan asam (BTA) dan ia juga lebih tahan terhadap gangguan kimia dan fisis (Sudoyo *et al.* 2006). Dapat tahan hidup di udara kering maupun dalam keadaan dingin, atau dapat hidup bertahun-tahun dalam lemari es. Ini dapat terjadi

apabila kuman berada dalam sifat dormant (tidur). Pada sifat dormant ini kuman tuberkulosis suatu saat dimana keadaan memungkinkan untuk berkembang, kuman ini dapat bangkit kembali (Hiswani 2004).

3. Klasifikasi Tuberkulosis

Klasifikasi tuberkulosis yang banyak dipakai di Indonesia adalah berdasarkan kelainan klinis, radiologis, dan mikrobiologis. Menurut Amin dan Bahar tahun 2009, klasifikasi tuberkulosis dibagi menjadi tiga, yaitu tuberkulosis paru, bekas tuberkulosis paru, dan tuberkulosis paru tersangka.

Tuberkulosis paru tersangka terbagi dalam:

3.1. Tuberkulosis paru tersangka yang diobati. Sputum BTA tidak ditemukan (negatif), tetapi tanda-tanda lain positif.

3.2. Tuberkulosis paru tersangka yang tidak terobati. Sputum BTA negatif dan tanda-tanda yang lain juga meragukan.

Dalam 2-3 bulan, TB tersangka ini sudah harus dipastikan apakah termasuk TB paru (aktif) atau bekas TB. Dalam klasifikasi ini perlu dicantumkan:

- 1) Status bakteriologi
- 2) Mikroskopik sputum BTA (langsung)
- 3) Biakan sputum BTA
- 4) Status radiologis, kelainan yang relevan untuk tuberkulosis paru, dan
- 5) Status kemoterapi, riwayat pengobatan dengan obat anti tuberculosis

WHO pada tahun 1991 mengategorikan penyakit tuberkulosis berdasarkan terapi ke dalam 4 kategori, yaitu:

- 1) Kategori I, ditujukan terhadap:
 - a. Kasus baru dengan sputum positif
 - b. Kasus baru dengan bentuk TB berat
- 2) Kategori II, ditujukan terhadap:
 - a. Kasus kambuh
 - b. Kasus gagal dengan sputum BTA positif
- 3) Kategori III, ditujukan terhadap:
 - a. Kasus BTA negatif dengan kelainan paru yang tidak luas
 - b. Kasus BTA ekstra paru selain yang disebut di dalam kategori I

4) Kategori IV, ditujukan terhadap TB kronik (Amin dan Bahar 2009).

4. Cara Penularan

TB ditularkan melalui udara (melalui percikan dahak penderita TB). Ketika penderita TB batuk, bersin, berbicara atau meludah, mereka memercikkan kuman TB atau bacilli ke udara (Depkes 2008a). Percikan dahak (droplet) yang mengandung kuman dapat bertahan di udara pada suhu kamar selama beberapa jam. Hanya droplet nukleus ukuran 1-5 μ (mikron) yang dapat melewati atau menembus sistem mukosilier saluran nafas sehingga dapat mencapai dan bersarang di bronkiolus dan alveolus (Widodo 2004). Setelah kuman TB masuk ke dalam tubuh manusia melalui pernafasan, kuman TB tersebut dapat menyebar dari paru ke bagian tubuh lainnya, melalui sistem peredaran darah, sistem saluran limfe, saluran nafas, atau penyebaran langsung ke bagian-bagian tubuh lainnya (Depkes 2000). Seseorang dapat terpapar dengan TB hanya dengan menghirup sejumlah kecil kuman TB. Penderita TB dengan status TB BTA (Basil Tahan Asam) positif dapat menularkan sekurang-kurangnya kepada 10-15 orang lain setiap tahunnya (Depkes 2008a).

5. Gejala

Gejala utama pasien TB paru adalah batuk berdahak selama 2-3 minggu atau lebih. Batuk dapat diikuti dengan gejala tambahan yaitu dahak bercampur darah, batuk darah, sesak nafas, badan lemas, nafsu makan menurun, berat badan menurun, malaise, berkeringat malam hari tanpa kegiatan fisik, demam meriang lebih dari satu bulan (Depkes 2006b).

6. Diagnosis

Semua suspek TB diperiksa 3 spesimen dahak dalam waktu 2 hari, yaitu sewaktu - pagi - sewaktu (SPS). Diagnosis TB Paru pada orang dewasa ditegakkan dengan ditemukannya kuman TB (BTA) (Depkes 2007). Kuman ini baru kelihatan dibawah mikroskopis bila jumlah kuman paling sedikit sekitar 5000 batang dalam 1 ml dahak. Dalam pemeriksaan dahak yang baik adalah dahak yang mukopurulen berwarna hijau kekuningan dan jumlahnya harus 3-5 ml tiap pengambilan (Hiswani 2004).

Pada program TB nasional, penemuan BTA melalui pemeriksaan dahak mikroskopis merupakan diagnosis utama. Pemeriksaan lain seperti foto toraks, biakan dan uji kepekaan dapat digunakan sebagai penunjang diagnosis sepanjang sesuai dengan indikasinya (Depkes 2006a). Tidak dibenarkan mendiagnosis TB hanya berdasarkan pemeriksaan foto toraks saja. Foto toraks tidak selalu memberikan gambaran yang khas pada TB paru, sehingga sering terjadi overdiagnosis. Gambaran kelainan radiologik Paru tidak selalu menunjukkan aktifitas penyakit (Depkes 2007)

Diagnosis TB dapat ditegakkan berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan fisis, pemeriksaan bakteriologi, radiologi dan pemeriksaan penunjang lainnya.

6.1. Gejala Klinis TB. dapat dibagi menjadi 2 golongan yaitu gejala lokal dan gejala sistemik. Bila organ yang terkena adalah paru maka gejala lokal adalah gejala respiratori (gejala lokal sesuai organ yang terlibat). Gejala respiratori terdiri dari batuk ≥ 2 minggu, batuk darah, sesak napas, dan nyeri dada. Sedangkan gejala sistemik terdiri dari demam, malaise, keringat malam, anoreksia dan berat badan menurun. Pada TB ekstraparu gejala tergantung dari organ yang terlibat, misalnya limfadenitis TB akan terjadi pembesaran yang lambat dan tidak nyeri dari kelenjar getah bening. Pada meningitis TB akan terlihat gejala meningitis. Sedangkan pada pleuritis TB terdapat gejala sesak napas dan kadang nyeri dada pada sisi yang rongga pleuranya terdapat cairan.

6.2. Pemeriksaan Fisis. Pada TB paru, kelainan yang didapat tergantung luas kelainan struktur paru. Pada permulaan (awal) perkembangan penyakit umumnya tidak (atau sulit sekali) menemukan kelainan. Kelainan paru pada umumnya terletak di daerah lobus superior terutama daerah apeks dan segmen posterior (S1 dan S2), serta daerah apeks lobus inferior (S6). Pada pemeriksaan fisik dapat ditemukan antara lain suara napas bronkial, amforik suara napas melemah, ronki basah, tanda-tanda penarikan paru, diafragma, dan mediastinum.

6.3. Pemeriksaan Bakteriologi. Bahan yang dapat digunakan untuk pemeriksaan bakteriologi adalah dahak, cairan pleura, *liquor cerebrospinal*, bilasan bronkus, bilasan lambung, kurasan bronkoalveolar (bronchoalveolar lavage/BAL), urine, feses dan jaringan biopsi (termasuk biopsi jarum halus/BJH).

Untuk pemeriksaan dahak dilakukan pengambilan dahak 2 kali dengan minimal satu kali dahak pagi hari.

6.4. Pemeriksaan Radiologi. Pemeriksaan standar yang dapat digunakan adalah foto toraks PA. Pemeriksaan lain atas indikasi yaitu foto lateral, *top-lordotic*, oblik, atau CT-Scan.

6.5. Pemeriksaan Penunjang Lain

6.5.1. Analisa Cairan Pleura. Pemeriksaan analisis cairan pleura dan uji Rivalta cairan pleura perlu dilakukan pada pasien efusi pleura untuk membantu menegakkan diagnosis. Interpretasi hasil analisis yang mendukung diagnosis TB adalah uji Rivalta positif dan kesan cairan eksudat, serta pada analisis cairan pleura terdapat sel limfosit dominan dan glukosa rendah.

6.5.2. Pemeriksaan Histopatologi Jaringan. Pemeriksaan histopatologi dilakukan untuk membantu menegakkan diagnosis TB. Bahan jaringan dapat diperoleh melalui biopsi atau autopsi.

6.5.3. Pemeriksaan Darah. Hasil pemeriksaan darah rutin kurang menunjukkan indikator spesifik untuk TB. Laju endap darah (LED) jam pertama dan kedua dapat digunakan sebagai indikator penyembuhan pasien. LED sering meningkat pada proses aktif, tetapi laju endap darah yang normal tidak menyingkirkan TB. Limfosit juga kurang spesifik (Kemenkes 2011a; Kemenkes 2011b).

7. Pengobatan

Pengobatan TB terbagi menjadi 2 fase yaitu fase intensif dan fase lanjutan. Pada umumnya lama pengobatan adalah 6-8 bulan. Obat lini pertama adalah Isoniazid (H), Rifampisin (R), Pirazinamid (Z), Etambutol (E), dan Streptomisin (S). Sedangkan obat lini kedua adalah kanamisin, kapreomisin, amikasin, kuinolon, sikloserin, etionamid, para-amino salisilat (PAS). Obat lini kedua hanya digunakan untuk kasus resisten obat, terutama TB *multidrug resistant* (MDR). Beberapa obat seperti kapreomisin, sikloserin, etionamid dan PAS belum tersedia di pasaran Indonesia tetapi sudah digunakan pada pusat pengobatan TB-MDR (Kemenkes 2011a; Kemenkes 2011b)

Pengobatan TB standar dibagi menjadi:

7.1. Kategori-1 (2HRZE/4H3R3). Kategori 1 ini dapat diberikan pada pasien TB paru BTA positif, TB paru BTA negatif foto toraks positif dan TB ekstra paru.

7.2. Kategori-2 (2HRZES/HRZE/5HRE). Kategori-2 ini diberikan pada pasien BTA positif yang telah diobati sebelumnya yaitu pada pasien kambuh, gagal maupun pasien dengan pengobatan setelah putus berobat (*default*). Pada pasien dengan riwayat pengobatan TB lini pertama, pengobatan sebaiknya berdasarkan hasil uji kepekaan secara individual. Selama menunggu hasil uji kepekaan diberikan panduan pengobatan 2HRZES/HRZE/5HRE. HRZE merupakan obat sisipan tahap intensif yang diberikan selama satu bulan.

7.3. Pasien *Multi-Drug Resistant* (MDR). Regimen standar TB MDR di Indonesia adalah: 6Z-(E)-Kn-Lfx-Eto-Cs/ 18Z-(E)-Lfx-Eto-Cs (Kemenkes 2011a; Kemenkes 2011b)

8. Evaluasi

8.1. Evaluasi Klinis. Pasien dievaluasi setiap 2 minggu pada 1 bulan pertama, pengobatan selanjutnya setiap 1 bulan. Evaluasi respon pengobatan dan ada tidaknya efek samping obat serta ada tidaknya komplikasi penyakit. Evaluasi klinis meliputi keluhan, berat badan, pemeriksaan fisik.

8.2. Evaluasi Bakteriologis (0-2-6/9 bulan pengobatan). Tujuan untuk mendeteksi ada tidaknya konversi dahak. Pemeriksaan dan evaluasi pemeriksaan mikroskopis dilakukan pada sebelum pengobatan dimulai, setelah 2 bulan pengobatan (setelah fase intensif) dan pada akhir pengobatan. Bila ada fasilitas biakan, dilakukan pemeriksaan biakan dan uji resistensi.

8.3. Evaluasi Radiologi (0-2-6/9 bulan pengobatan). Pemeriksaan dan evaluasi foto toraks dilakukan pada sebelum pengobatan, setelah 2 bulan pengobatan (kecuali pada kasus yang juga dipikirkan kemungkinan keganasan dapat dilakukan 1 bulan pengobatan) dan pada akhir pengobatan.

8.4. Evaluasi Efek Samping Secara Klinis. Bila pada evaluasi klinis dicurigai terdapat efek samping, maka dilakukan pemeriksaan laboratorium untuk memastikannya dan penanganan efek samping obat sesuai pedoman.

8.5. Evaluasi Keteraturan Berobat. Yang tidak kalah pentingnya adalah evaluasi keteraturan berobat dan diminum/tidaknya obat tersebut. Ketidakteraturan berobat akan menyebabkan timbulnya masalah resistensi (PDPI 2006)

9. Program DOTS

WHO merekomendasikan strategi DOTS (*Directly Observed Treatment Short-Course*) sebagai upaya pendekatan kesehatan yang paling tepat untuk menanggulangi masalah tuberkulosis (Hasri *et al.* 2013) dan menerapkannya dalam manajemen penderita TB untuk menjamin pasien menelan obat, dilakukan pengawasan langsung oleh seorang pengawas minum obat (PMO) (Depkes 2008b).

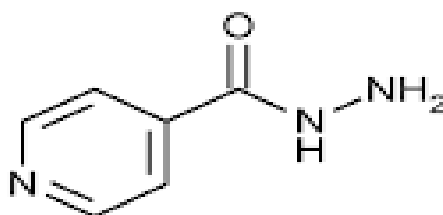
Penderita harus menerima *treatment* yang tertata dalam sistem pengelolaan, distribusi dengan penyediaan obat yang cukup. Kemudian, setiap penderita harus mendapat obat yang baik, artinya pengobatan *short course standard* yang telah terbukti ampuh secara klinis (Aditama 2001).

Pelaksanaan DOTS bertujuan untuk menjamin kesembuhan bagi penderita, mencegah penularan, mencegah resistensi obat, mencegah putus berobat dan segera mengatasi efek samping obat jika timbul, yang pada akhirnya dapat menurunkan angka kesakitan dan kematian akibat tuberkulosis di dunia (Sari 2001, PDPI 1998).

B. Isoniazid

1. Struktur Kimia Isoniazid

Isoniazid memiliki rumus kimia $C_6H_7NO_3$ (BM 137,1) dan sinonimnya adalah INAH; INH; *Isonicotinic Acid Hydrazide*; *Isonicotinoylhydrazine*; *Isonicotinylhydrazide*; *Isonicotinylhydrazine*; *Tubazid*; *4-Pyridinecarboxylic acid hydrazide*. Nilai logP -0,70 dan pKa 1,82 (TCIHR 2013).



Gambar 2. Struktur Kimia Isoniazid (Depkes 1979)

2. Pemerian dan Kelarutan Isoniazid

Isoniazid berupa kristal tidak berwarna atau serbuk kristal putih, mempunyai kelarutan mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol (95%), sukar larut dalam kloroform, praktis tidak larut dalam benzene dan eter (Depkes 1979).

3. Kegunaan Isoniazid

Derivat asam isonikotinat ini berkhasiat tuberkulosis paling kuat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (dalam fase istirahat) dan bersifat bakterisid terhadap basil yang sedang tumbuh pesat (Tjay dan Rahardja 2007). Dosis dewasa isoniazid 300 mg per hari (5-10 mg/kg/BB) (Dipiro 2005).

4. Efek Samping Isoniazid

Efek samping seperti gatal-gatal dan ikterus pada dosis normal 300 mg sehari ringan dan jarang terjadi tetapi pada dosis melebihi 400 mg sering terjadi efek samping seperti polyneuritis, kerusakan hati dan icterus yang fatal (Tjay & Kirana 2007).

5. Mekanisme Kerja Isoniazid

Mekanisme kerja isoniazid bersifat kompleks, disertai pemetaan resistensi terhadap mutasi pada sedikitnya lima gen yang berbeda (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, dan *ndh*). Sebagian besar bukti menunjukkan *inhA* sebagai target utama obat. Gen *inhA* mengodekan enoil-ACP redukse pada asam lemak sintesis II yang mengubah asam-asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak jenuh pada jalur biosintesis asam mikolat (Goodman & Gilman 2014). Mekanisme kerja isoniazid yang lain yaitu berdasarkan terganggunya sintesis asam mikolat yang diperlukan untuk membangun dinding sel bakteri (Tjay dan Rahardja 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 dan Setiabudy 2007, diacu dalam Stella 2011) dan pada bakteri yang semi dorman, isoniazid bersifat bakteriostatik (Martindale 2007, diacu dalam Stella 2011).

6. Farmakokinetik Isoniazid

Di dalam tubuh INH terikat protein plasma 10 % didistribusikan dengan cepat dalam cairan tubuh dan jaringan-jaringan, serta dijumpai kadarnya yang cukup dalam fokus caseous. INH dimetabolisme dalam hati dalam bentuk tidak aktif. Inaktivasi INH terjadi dalam hati oleh enzim N-acetyl transferase yang mengubah isoniazid menjadi acetyl isoniazid, yang mempunyai 2 bentuk yaitu monoacetyl hidrazine dan Isonicotinic acid. Monoacetyl hidrazine kemudian diasetilasi menjadi diacetyl hidrazine dan Isonicotinic acid, yang bersatu secara langsung membentuk Isonicotinyl glicine. Isoniazid juga bergabung secara langsung membentuk acid labile hydrazone. INH yang tidak diasetilasi dikeluarkan lewat urin dalam bentuk tidak berubah atau terikat dengan hydrazone.

Berdasarkan kecepatan rata-rata asetilasi enzim hepatic (N acetyl transferase), maka dibuat pembagian atas dua kelompok, yakni slow inactivator dan rapid inactivator. Pada kelompok slow inactivator relatif kekurangan enzim hepatic transferase, memerlukan dosis pengobatan isoniazid yang lebih kecil, dengan waktu paruh rata-rata $3 + 0,8$ jam. Sedangkan rapid inactivator relatif kelebihan enzim hepatic transferase, memerlukan dosis lebih besar dan mempunyai waktu paruh rata-rata $1,1 + 0,2$ jam.

Isoniazid akan mencapai kadar plasma puncak dalam 1-2 jam sesudah pemberian dosis peroral 300 mg menghasilkan konsentrasi plasma puncak 3-5 $\mu\text{g/ml}$ (Katzung 2005, diacu dalam Stella 2011). Ekskresinya terutama melalui ginjal sebesar 75-95% dalam 24 jam sebagian besar sebagai asetilisoniazid (Tjay dan Rahardja 2007)

Isoniazid memiliki $t_{1/2}$ plasma antara 1-4 jam tergantung dengan kecepatan asetilasi. Kecepatan proses asetilasi yang memengaruhi kadar obat dalam plasma

dan waktu paruhnya tergantung dari banyaknya asetiltransferase yang pada masing-masing orang berbeda secara genetik (Tjay dan Rahardja 2007)

6. Interaksi Isoniazid

Antikonvulsan seperti fenitoin dan karbamazepin adalah yang sangat terpengaruh oleh isoniazid, isofluran, paracetamol dan karbamazepin, menyebabkan hepatotoksisitas, antasida dan adsorben menurunkan absorpsi, sikloserin meningkatkan toksisitas pada SSP, menghambat metabolisme karbamazepin, etosuksimid, diazepam, menaikkan kadar plasma teofilin (Depkes 2006a).

C. Plasma dan Darah

Darah lengkap berisi unsur-unsur seluler yang terdiri dari sel darah merah, sel darah putih, platelet, dan berbagai macam protein lain seperti albumin dan globulin. Secara umum, serum atau plasma digunakan untuk pengukuran obat. Perbedaan serum dan plasma yaitu: Untuk memperoleh serum, darah dibiarkan menggumpal kemudian disentrifugasi. Supernatan yang diperoleh setelah disentrifugasi itulah yang disebut serum. Serum tidak mengandung fibrinogen. Sedangkan plasma diperoleh dari darah yang telah ditambahkan antikoagulan seperti heparin, kemudian disentrifugasi, supernatannya inilah yang disebut plasma (Shargel 1941).

D. Kadar Obat dalam Plasma

1. Arti Penting Kadar Obat dalam Plasma

Parameter farmakokinetik diperoleh berdasar data penetapan kadar obat / metabolitnya dalam cairan hayati, dengan kata lain konsentrasi obat merupakan unsur penting dalam penentuan farmakokinetik individual/populasi. Konsentrasi obat dapat ditentukan dalam berbagai cairan hayati seperti, darah, urine, saliva, dan juga air susu ibu (Shargel *et al.* 2012). Untuk dapat menilai suatu obat secara klinis, menetapkan dosis, dan skema penakarannya yang tepat, perlu adanya sejumlah data farmakokinetik. Khususnya mengenai kadar obat di tempat tujuan dan dalam darah, serta perubahan kadar ini dalam waktu tertentu. Pada umumnya

besarnya efek obat bergantung pada konsentrasinya di target aksinya itu dan ini berhubungan erat dengan konsentrasi plasma. Pada obat yang absorpsinya baik, kadar plasma meningkat bila dosis-nya diperbesar (Sutarno 2000).

Pengukuran kadar obat dalam plasma menggunakan metode analisis hayati yang sudah tervalidasi, sehingga dihasilkan informasi yang akurat untuk pemantauan farmakokinetik dan klinis (Shargel *et al.* 2012). Kadar obat dalam plasma, yang nilainya kurang lebih sama dengan konsentrasinya dalam darah, dapat diukur dengan alat-alat modern dengan ketelitian dari satu per seribu mg (0,001 mg) (Sutarno 2000). Untuk suatu obat yang diberikan dalam dosis oral berulang waktu yang diperlukan untuk mencapai keadaan tunak bergantung pada waktu paruh eliminasi obat. Dari segi klinik, waktu yang diperlukan untuk mencapai 99% dari konsentrasi tunak dalam plasma adalah 6,6 waktu paruh eliminasi (Shargel 1988, diacu dalam Fentimalia 2010).

2. Penetapan Kadar Obat dalam Darah

Salah satu kegiatan di dalam farmasi klinik adalah adanya monitoring kadar obat di dalam darah. Terdapat banyak hal yang harus dipertimbangkan di dalam melakukan penetapan kadar obat di dalam darah, diantaranya: (Herdwiani *et al.* 2016)

Pertama, harus dipertimbangkan manfaat dan risikonya. Sebelum dilakukan penetapan kadar obat dalam darah perlu dipelajari terlebih dahulu ada tidaknya hubungan antara kadar obat dalam darah dengan efek farmakologi dan toksikologi.

Kedua, penetapan kadar obat di dalam darah tidak cukup dilakukan sekali sampling saja, karena tidak dapat diperoleh profil yang lengkap.

Ketiga, di klinik pengambilan darah untuk penetapan kadar obat pasien menemui sejumlah kendala, diantaranya mahal, memerlukan ijin dokter penanggungjawab pengobatan.

Walaupun demikian penetapan kadar obat di dalam darah tetap bisa dilakukan di laboratorium farmakokinetik klinik. Penetapan kadar menggunakan prosedur baku dan dengan mempertimbangkan penggunaan metode yang baik,

seperti akurasi, ketelitian dan perolehan kembali serta sensitivitas dan selektivitas yang tinggi (Ritschel & Kearns 2009).

3. Interpretasi Klinik Terhadap Kadar Obat dalam Darah

Intepretasi dilakukan dengan membandingkan kadar obat dalam darah yang teramati dengan kadar obat dalam range terapi. Jika kadar obat dalam darah di atas KTM maka bisa dilakukan evaluasi terhadap gejala toksisitas pasien (Karen 2011). Apabila kadar obat di bawah KEM, maka terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan seperti, kepatuhan pasien perlu dilihat apakah pasien sudah mengonsumsi obat dengan tepat waktu, mengingat obat memiliki durasi tertentu sehingga pasien harus mengonsumsi obat dalam jadwal tertentu agar konsentrasi obat dalam plasma tetap berada di daerah terapi (Herdwiani *et al.* 2016).

Bioavaibilitas (ketersediaan hayati) menunjukkan suatu pengukuran laju dan jumlah bahan aktif atau bagian aktif yang diabsorpsi dari suatu produk obat dan tersedia pada target aksinya (Shargel *et al.* 2012). Apabila bioavaibilitas obat kecil maka dipastikan hanya sedikit juga konsentrasi obat yang sampai di target aksi/reseptor sehingga tidak memberikan efek terapeutika, yang dapat dikatakan pula bahwa konsentrasi obat berada di bawah KEM (Ritschel & Kearns 2009).

E. Farmakokinetika

1. Pengertian Farmakokinetika

Farmakokinetik mempelajari perubahan-perubahan konsentrasi obat dalam organisme terhadap waktu meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme dan eliminasi (Mustschler 1991). Obat dalam tubuh mengalami perjalanan dari organ satu ke organ yang lain, dimana sifat fisika-kimia obat sangat mempengaruhi proses atau nasib obat dalam organ-organ tersebut. Farmakokinetika seringkali juga disebut ilmu yang mempelajari nasib obat dalam tubuh (Soetarno 2009).

2. Profil Farmakokinetika

2.1. Absorpsi. Absorpsi adalah pengambilan obat dari permukaan tubuh (di sini termasuk juga mukosa saluran cerna atau dari tempat-tempat tertentu dalam

organ dalam ke dalam aliran darah atau ke dalam sistem pembuluh limfe (Mutschler 1991).

2.2. Distribusi. Obat yang telah melalui hati bersamaan dengan metabolitnya disebarkan secara merata ke seluruh jaringan tubuh, khususnya melalui peredaran darah. Seringkali distribusi obat tidak merata akibat adanya gangguan misalnya tintangan darah ke otak (*cerebro spinal barrier*) dan terikatnya obat pada protein darah atau jaringan serta lemak (Tan dan Kirana 2007).

2.3. Metabolisme. Metabolisme merupakan suatu proses agar obat menjadi lebih polar atau hidrofilik agar dapat dieliminasi dari tubuh. Proses ini sebagian besar terjadi di hati dengan 2 fase reaksi yaitu reaksi fase I oleh sittokrom P₄₅₀ dan reaksi fase II. Pada reaksi fase I terdapat beberapa jenis reaksi diantaranya hidrolisis, oksidasi, reduksi, demetilasi, metilasi dan dehydrogenase alkohol. Sedangkan pada reaksi fase II jenis reaksi diantaranya glisin konjugasi, glukoronida dan sulfat konjugasi (Ristchel & Kearns 2004).

2.4. Ekskresi. Proses ekskresi menyebabkan hilangnya obat dalam tubuh yang dapat terjadi melalui berbagai organ, yaitu paru-paru, empedu, ginjal. Organ paru-paru melalui nafas, saliva, keringan air susu. (Ristchel & Kearns 2004).

3. Parameter Farmakokinetika

Parameter Farmakokinetika suatu obat dihitung dari konsentrasi obat dalam cuplikan hayati yang sesuai, dapat berupa darah, urin, air ludah, dahak, cairan lainnya yang relevan atau mengandung obat, tetapi yang paling sering digunakan adalah darah atau urin (Soetarno 2009).

3.1. Bioavaibilitas. Bioavaibilitas atau ketersediaan hayati (F) adalah presentase obat yang secara utuh mencapai sirkulasi umum untuk melakukan kerjanya (Tan dan Kirana. 2007).

3.2. Area di Bawah Kurva (*Area Under Curve*). Area di bawah kurva (AUC) adalah permukaan di bawah kurva (grafik) yang menggambarkan naik turunnya kadar plasma sebagai fungsi dari waktu (Tan dan Kirana. 2007).

3.3. Volume Distribusi. Volume distribusi (Vd) merupakan volume semu yang menggambarkan luasnya penyebaran obat dalam tubuh dengan kadar plasma

atau serum. Nilai V_d dipengaruhi oleh ukuran, komposisi tubuh, kemampuan molekul obat memasuki berbagai kompartemen tubuh dan derajat ikatan protein plasma (Ritschel & Kearns 2004).

3.4. Waktu Paruh Eliminasi. Waktu paruh eliminasi ($t_{1/2}$) adalah rentang waktu dimana kadar obat dalam plasma pada fase eliminasi menurun sampai separuhnya. Turunnya kadar plasma obat dan lama efeknya tergantung pada kecepatan metabolisme dan ekskresi (Tan dan Kirana. 2007).

3.5. Klirens. Bersihan atau klirens (Cl) menggambarkan volume darah yang dibersihkan dari obat tiap satuan waktu (ml/menit). Klirens renal (Cl_r) untuk obat-obat yang bersifat hidrofil sehingga dapat dieliminasi melalui ginjal. Klirens hepatic (Cl_h) untuk obat-obat yang bersifat lipofil maka akan dieliminasi melalui hepar (Ritschel & Kearns 2004).

4. Model Kompartemen

4.1. Model Kompartemen Satu Terbuka. Tubuh dianggap hanya satu kompartemen, dimana yang dimasukkan ke dalam tubuh akan segera mencapai kesetimbangan antar obat dalam darah dengan obat dalam jaringan atau cairan tubuh yang lain (Soetarno 2009). Jumlah obat yang ada dalam tubuh berkaitan dengan banyaknya obat yang diabsorpsi.

$$D_B = \frac{k_a F D_o}{k_a - k} (e^{-kt} - e^{-k_a t}) \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan	:
K_a	: tetapan laju absorpsi
F	: fraksi obat yang diabsorpsi dinyatakan dalam pecahan desimal
D_o	: dosis
t	: waktu

Konsentrasi obat dalam plasma

$$C_p = \frac{k_a F D_o}{V_d (k_a - k)} (e^{-kt} - e^{-k_a t}) \dots \dots \dots (2)$$

Tetapan laju absorpsi (K_a). Tetapan laju absorpsi (K_a) dapat ditentukan dengan metode residual, hasilnya baik jika perbedaan K_a dan K cukup besar yaitu $K_a : K$ lebih besar atau sama dengan 3. Hasil perbedaan antara K_a dan K kurang

dari itu menggunakan metode kuadrat kecil atau *least square regression (LSR)* (Soetarno 2009).

Waktu yang dibutuhkan obat untuk mencapai puncak (t_{max})

$$t_{max} = \frac{2,3 \log\left(\frac{k_a}{k}\right)}{k_a - k} \dots\dots\dots(3)$$

Konsentrasi obat mencapai puncak (Cp_{max})

$$Cp_{max} = \frac{F \cdot D_0}{V_d} (e^{kt_{max}}) \dots\dots\dots(4)$$

Tetapan laju eliminasi (K)

$$\frac{dDu}{dt} = \frac{k_a F D_0 k_e}{k_a - k} (e^{-kt}) \dots\dots\dots(5)$$

4.2. Model Kompartemen Dua Terbuka. Model kompartemen

dua dianggap bahwa obat terdistribusi ke dalam dua kompartemen. Kompartemen ke satu dikenal sebagai kompartemen sentral yaitu darah, cairan ekstraseluler dan jaringan-jaringan dengan perfusi tinggi, kompartemen-kompartemen ini secara cepat terdifusi oleh obat. Kompartemen kedua merupakan jaringan yang berisi jaringan-jaringan yang berkesetimbangan secara lambat dengan obat (Shargel & Yu 1999). Proses absorpsi sebelum obat didistribusikan memang harus terjadi pada saat penggunaan obat secara ekstravaskuler, sehingga kinetika perubahan kadar obat tidak berubah dalam darah sebagai fungsi waktu mengikuti persamaan trieksponensial berikut.

$$Cp = L \cdot e^{-\alpha \cdot t} + M \cdot e^{-\beta \cdot t} + N \cdot e^{-k_a \cdot t} \dots\dots\dots(6)$$

$$L = \frac{k_a \cdot F \cdot D (k_{21} - \alpha)}{V_s (k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} \dots\dots\dots(7)$$

$$M = \frac{k_a \cdot F \cdot D (k_{21} - \beta)}{V_s (k_a - \beta)(\alpha - \beta)} \dots\dots\dots(8)$$

$$N = \frac{k_a \cdot F \cdot D (k_{21} - k_a)}{V_s (\alpha - k_a)(\beta - k_a)} \dots\dots\dots(9)$$

Nilai K_a diasumsikan lebih besar daripada nilai α dan β . Nilai $N \cdot e^{-k_a \cdot t}$ dan $L \cdot e^{-\alpha \cdot t}$ akan mendekati nol lebih cepat daripada nilai $M \cdot e^{-\beta \cdot t}$, sehingga persamaan 6 dapat disederhanakan menjadi persamaan 10. Selanjutnya persamaan 6 dirubah menjadi bentuk logaritmanya (persamaan 11).

$$Cp = M \cdot e^{-\beta \cdot t} \dots\dots\dots(10)$$

$$\text{Log } C_p = \text{Log } M - \frac{\beta \cdot t}{2,303} \dots\dots\dots(11)$$

Nilai β dapat diperoleh dari angka slope x 2,303. Intersep ekstrapolasi persamaan 24 pada $t=0$ memberikan nilai log M. Selisih kadar obat sesungguhnya dalam plasma dengan kadar obat pada ekstrapolasi merupakan kadar obat residual pertama (persamaan 1). Kurva kadar obat residual pertama lawan waktu akan menunjukkan kurva biekspensial. Asumsinya yaitu $K_a > \alpha$, maka nilai $N \cdot e^{-k_a \cdot t}$ akan mendekati nol relatif lebih cepat daripada nilai $L \cdot e^{-\alpha \cdot t}$ sehingga persamaan 11 akan menjadi persamaan 12. Persamaan 12 diubah dalam bentuk logaritmanya (persamaan 14).

$$C_{prI} = L \cdot e^{-\alpha \cdot t} + N \cdot e^{-k_a \cdot t} \dots\dots\dots(12)$$

$$C_{prI} = L \cdot e^{-\alpha \cdot t} \dots\dots\dots(13)$$

$$\text{Log } C_{prI} = \text{log } L - \frac{\alpha \cdot t}{2,303} \dots\dots\dots(14)$$

F. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. Definisi KCKT

Kromatografi cair kinerja tinggi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran antara dua fase yaitu fase diam (padat) dan fase gerak (cair). Kromatografi cair kinerja tinggi menurut Farmakope Edisi IV adalah metode pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi menggunakan teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi dan detector yang sensitif (Depkes 1995).

Pemisahan terjadi karena molekul sampel tertahan oleh fase diam atau dibawa oleh fase gerak, tergantung dari afinitas senyawa tersebut terhadap kedua fase ini. Solut-solut yang kuat akan keluar kolom lebih lama. Komponen campuran yang keluar kolom dideteksi oleh detektor, kemudian direkam dalam bentuk kromatogram (Hendayana 2006).

Kromatografi fase balik merupakan kondisi dimana fase gerak lebih polar daripada fase diam. Pemisahan dengan kromatografi fase balik dilakukan pada fase diam yang silikanya telah dimodifikasi, dimana partikel silika pada fase diam

direaksikan secara kimia dengan menggunakan reagen klorosilan menghasilkan permukaan yang non polar yaitu Okta Desil Silika (ODS C18)(Rohman, 2007).

2. Keuntungan KCKT

Kromatografi cair kinerja tinggi mempunyai keuntungan yaitu cepat dan resolusinya tinggi, sensitivitas detektor, kolom yang dapat digunakan kembali, mudah rekoverti sampel dan ideal untuk zat yang bermolekul besar atau kecil.

2.1. Cepat dan Resolusi Tinggi. Waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit, untuk analisis yang tidak rumit waktu analisis kurang dari 1 menit. Kromatografi cair kinerja tinggi mempunyai dua fase dimana interaksi selektif dapat terjadi. Kemampuan zat yang dianalisis berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak pada kromatografi cair kinerja tinggi memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.

2.2. Sensitivitas Detektor. Detektor absorpsi UV yang biasa digunakan dalam kromatografi cair kinerja tinggi dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10^{-9} gram) dari bermacam-macam zat. Detektor-detektor fluoresensi dan elektrokimia dapat mendeteksi jumlah sampai pictogram (10^{-12} gram).

2.3. Kolom yang dapat Digunakan Kembali. Banyak analisis yang dapat dilakukan dengan kolom yang sama sebelum kolom tersebut diganti. Kolom dapat mengalami laju penurunan mutu akibat dari jenis sampel yang diinjeksi, kebersihan dari solven dan jenis solven yang digunakan.

2.4. Mudah Rekoverti Sampel dan Ideal untuk Zat Bermolekul Besar atau Kecil. Detektor kromatografi cair tidak merusak komponen zat yang dianalisis, sehingga zat tersebut dapat mudah dikumpulkan setelah melewati detektor. Kromatografi cair kinerja tinggi dengan tipe eksklusi dan penukaran ion ideal dapat untuk menganalisis zat bermolekul besar dan ionik (Effendy 2004).

3. Instrumentasi KCKT

3.1. Fase Gerak. Fase gerak dalam KCKT adalah berupa zat cair dan disebut juga eluen atau pelarut. Fungsi dari fase gerak adalah sebagai pembawa komponen-komponen campuran menuju detektor, selain itu fase gerak juga dapat berinteraksi dengan solut-solut (Hendayana 2006). Fase gerak harus memenuhi

syarat yaitu murni, tidak bereaksi dengan kemasan, sesuai dengan detektor, dapat melarutkan cuplikan, mempunyai viskositas rendah, harganya wajar serta memungkinkan memperoleh kembali cuplikan dengan mudah. Pemilihan fase gerak didasarkan atas eksperimen *trial and error* dengan berbagai jenis dan komposisi pelarut hingga diperoleh kromatogram yang diharapkan (Hendayana 2006).

3.2. Pompa. Pompa dalam KCKT berfungsi untuk mengalirkan fase gerak cair melalui kolom yang berisi serbuk halus. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Pompa harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit untuk tujuan preparatif (Gandjar dan Rohman 2007). Jenis pompa ada tiga, yaitu pompa *reciprocating*, *displacement*, dan *pneumatic* (Hendayana 2006).

3.3. Kolom. Kolom utama berisi fase diam, tempat terjadinya pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya. Kolom KCKT biasanya terbuat dari *steinless steel* walaupun ada juga yang terbuat dari gelas berdingding tebal dengan ukuran panjang berkisar antara 5-30 cm dan berdiameter dalam berkisar antara 4-10 mm. Kolom pengaman disebut juga pra kolom karena diletakkan sebelum system pemasukan cuplikan dengan ukuran 5 cm dengan diameter 4,6 mm (Hendayana 2006).

3.4. Detektor. Detektor harus memenuhi syarat yaitu cukup sensitif, stabilitas dan keterulangan tinggi, respon linear terhadap solut, waktu respon pendek sehingga tidak bergantung kecepatan alir, reabilitas tinggi dan mudah digunakan dan tidak merusak cuplikan. Detektor terbagi dalam dua macam, yaitu detektor UV dan detektor elektrokimia (Hendayana 2006). Terdapat macam-macam detektor (Johnson dan Stevenson 1991) :

3.4.1. Detektor Serapan Optik. Detektor serapan optik mendeteksi komponen zat yang menyerap cahaya di daerah UV (190-240 nm), tampak (400-700 nm) dan inframerah (2-5 μm).

3.4.2. Detektor Indeks Bias. Detektor indeks bias memberikan respon akibat perubahan indeks bias pelarut yang disebabkan adanya cuplikan dalam eluen kolom.

3.4.3. Detektor Fluoresensi. Detektor fluoresensi hanya dapat mendeteksi komponen-komponen zat yang dapat berfluoresensi kepekaannya cukup tinggi karena hanya komponen tertentu yang memberikan respon.

3.4.4. Detektor Elektrokimia. Detektor ini didasarkan pada daya hantar listrik. Detektor elektrokimia mendeteksi komponen-komponen zat yang dapat mengalami reduksi atau oksidasi pada senyawa organik maupun anorganik.

3.4.5. Detektor Radioaktif. Detektor radioaktif mendeteksi senyawa-senyawa yang mengeluarkan radiasi. Detektor ini mempunyai kemampuan besar untuk kajian nasib obat dan penimbunan senyawa berlabel dan hewan percobaan, tetapi penggunaannya tidak banyak dikarenakan rumit.

3.5. Integrator. Perekam pada KCKT memiliki integrator, berfungsi untuk menghitung luas puncak. Macam integrator ada dua yaitu integrator cakram yang bekerja secara mekanik dan integrator digital atau elektronik yang dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu integrasi yang singkat (Gritter *et al.* 1985). Komputer merupakan integrator digital mengukur luas puncak dengan sangat baik, tetapi tidak menghitung susunan atau menafsirkan data. Terdapat 2 pendekatan yang digunakan yakni saluran tunggal (satu komputer disambungkan dengan satu kromatograf) dan nekasaluran (beberapa kromatograf disambungkan *on-line dengan* satu komputer)(Johnson dan Stevenson 1991).

4. Sistem Pemisahan KCKT

4.1. Sistem Isokratik. Sistem isokratik merupakan suatu teknik pemisahan dimana selama proses pengukuran berlangsung fase gerak atau komposisi fase gerak tidak berubah, sehingga tidak perlu mengatur komposisi campuran fase gerak (Hendayana 2006).

4.2. Sistem Gradient. Sistem gradient merupakan teknik pemisahan dimana selama pengukuran berlangsung komposisi fase gerak berubah atau divariasikan secara periodik dengan tujuan untuk memisahkan campuran dengan polaritas yang sangat beragam (Hendayana 2006).

5. Pengukuran Kinerja Kolom

Pengukuran kinerja kolom terdiri dari resolusi dan efisiensi kolom.

5.1. Resolusi. Nilai resolusi $>1,5$ dinyatakan hasil pemisahan yang dihasilkan baik atau $>99,7\%$ dan bila nilai resolusi $<1,5$ maka nilai yang dihasilkan tidak baik. Cara menghitung resolusi terdapat pada persamaan 15 (Johnson dan Stevenson 1991).

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_2 + w_1}{2}} = \frac{2 \Delta t_R}{w_2 + w_1} \dots\dots\dots(15)$$

Harga t_{R1} dan t_{R2} adalah waktu retensi komponen 1 dan 2, diukur pada titik maksimum puncak dan ΔT adalah selisih antara t_{R1} dan t_{R2} . Harga w_1 dan w_2 adalah lebar alas puncak komponen 1 dan 2, dinyatakan dalam satuan waktu. Jika puncak terelusi dengan waktu retensi yang serupa maka lebar alas puncak hampir sama, sehingga harga daya pisah (R) dapat diperoleh melalui persamaan 16 (Johnson dan Stevenson 1991).

$$\text{Jika } w_2 \cong w_1, \text{ maka } R = \frac{\Delta t}{w_2} \dots\dots\dots(16)$$

5.2. Efisiensi Kolom. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis atau HETP (*High Equivalent of a Theoretical Plate*). HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antar eluen dan kolom, sesuai persamaan 17 (Johnson dan Stevenson 1991).

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \dots\dots\dots(17)$$

- Keterangan :
- HETP : ukuran efisiensi kolom
- L : panjang kolom (mm)
- N : jumlah plat teoritis

Harga N dihitung dengan menggunakan persamaan 18 (Johnson dan Stevenson 1991).

$$N = \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5,5 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2 \dots\dots\dots(18)$$

- Keterangan :
- t_R : waktu retensi
- w : lebar puncak
- $w_{1/2}$: lebar puncak pada setengah tinggi

Ukuran efisiensi kolom (HETP) semakin kecil berarti kolom semakin efisien. Kolom yang baik mempunyai HETP yang kecil dan N yang besar (Johnson dan Stevenson 1991).

6. Analisis dalam KCKT

6.1. Analisis kualitatif. Analisa kualitatif dapat dilihat dari waktu retensi (t_R) dan volume retensi (V_r). Waktu retensi atau volume retensi dapat dipakai untuk mengidentifikasi suatu senyawa dengan cara membandingkan dengan standar (Johnson dan Stevenson 1991) sesuai rumus 19.

$$R_i = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}} \dots \dots \dots (19)$$

Keterangan :

t_{Ri} : waktu retensi komponen zat

t_{Rst} : waktu retensi standart

Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama (Johnson dan Stevenson 1991).

6.2. Analisis Kuantitatif. Analisa kuantitatif pada KCKT, dasar perhitungan adalah dengan mengukur tinggi atau luas puncak zat yang akan dianalisis. Ada beberapa metode kuantitatif yang dapat digunakan:

6.2.1. Baku luar. Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya, kemudian dibuat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Larutan sampel yang akan dianalisis disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot puncak sampel pada kurva kalibrasi sampel dengan perbandingan langsung, sesuai rumus 20.

$$C_s = \frac{A_s}{A_{st}} \times C_{st} \dots \dots \dots (20)$$

Keterangan :

C_s = konsentrasi sampel

C_{st} = konsentrasi standart

A_s = luas puncak sampel

A_{st} = luas puncak standart

Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

6.2.2. Baku dalam. Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standart kemudian larutkan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (Johnson dan Stevenson 1991).

6.2.3. Adisi. Metode ini ditambahkan sejumlah standar pada sampel, dilakukan dua kali jumlah sampel yang sama. Data tersebut diinterpolasi, dimana hasil perpotongan terhadap jumlah penambahan standar diperoleh kadar sampel. Cara ini digunakan untuk kadar zat dalam sampel yang terlalu rendah serta tidak memungkinkan digunakan baku dalam (Johnson dan Stevenson 1991).

7. Validasi

Validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Gandjar dan Rohman 2009). Pengukuran terhadap analit dalam matriks biologis harus mengalami proses validasi terlebih dahulu. Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas (FDA 2001).

7.1. Batas Deteksi (*Limit of detection, LOD*). Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu.

$$LOD = 3,3 \times \frac{S_b}{slope} \dots\dots\dots(21)$$

Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi (Gandjar dan Rohman 2007).

7.2. Batas Kuantifikasi (*limit of quantification, LOQ*). Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang

dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Rumus LOQ yaitu:

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_b}{\text{slope}} \dots\dots\dots(22)$$

Jika konsentrasi LOQ menurun, maka presisi juga menurun, sebaliknya jika presisi tinggi dipersyaratkan maka konsentrasi LOQ yang lebih tinggi harus dilaporkan (Gandjar dan Rohman 2007).

7.3. Spesifisitas (Selektivitas). Spesifisitas atau selektivitas suatu metode adalah kemampuan metode analisis untuk membedakan dan mengukur analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (cairan biologis). Pada uji selektivitas 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*) (Huber 2007).

7.4. 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 standars harus memenuhi syarat di atas, termasuk LLOQ dan konsentrasi tertinggi dari kalibrasi standar (FDA 2001).

7.5. Linearitas. Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Data yang diperoleh dapat menentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (Gandjar dan Rohman 2009). Penentuan linearitas kurva kalibrasi isoniazid BPHI ditentukan berdasarkan luas puncak. Menurut Johnson dan Stevenson (1991), penentuan kadar dapat dilakukan dengan mengukur luas puncak atau tinggi puncak. Baik tinggi puncak maupun luasnya dapat dihubungkan dengan konsentrasi. Tinggi puncak mudah diukur, akan tetapi sangat dipengaruhi perubahan waktu retensi yang disebabkan oleh variasi suhu dan komposisi pelarut. Nilai r memenuhi standar linearitas yang ditetapkan yaitu lebih besar dari 0,95 (Shargel 1988, diacu dalam Lestari 1994).

7.6. Ketepatan (akurasi). Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konversi, nilai sebenarnya atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh pada suatu pengukuran sampel dengan cara membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar. Data yang dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Nilai % diff untuk mengukur akurasi disyaratkan kurang dari 15%.

7.7. Presisi. Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Presisi seringkali diekspresikan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data, sementara itu nilai RSD dirumuskan dengan (Gandjar dan Rohman 2009) :

$$RSD = \frac{100 \times SD}{X} \dots\dots\dots(23)$$

- Keterangan :
- X = rata-rata data
- SD = standar deviasi serangkaian data

% RSD pada larutan yang mengandung zat aktif dengan konsentrasi ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$ adalah $<5,3\%$ (Huber 2007, diacu dalam Nugraheni dan Anggoro 2016).

7.8. Uji Perolehan Kembali (*Recovery*). 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. 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% rekovery (FDA 2001). Persyaratan *recovery* untuk sampel dengan konsentrasi 100 ng/ml-10 $\mu\text{g/ml}$ adalah 80-110% (Huber 2007, diacu dalam Lestari 20014).

G. Landasan Teori

Tuberkulosis (TB) adalah suatu penyakit infeksi menular yang disebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menyerang berbagai organ, terutama paru-paru (Kemenkes 2015). Pengobatan TB terbagi menjadi 2 fase yaitu fase intensif dan fase lanjutan. Pada umumnya lama pengobatan adalah 6-8 bulan. Obat lini pertama adalah Isoniazid (H), Rifampisin (R), Pirazinamid (Z), Etambutol (E), dan Streptomisin (S). Sedangkan obat lini kedua adalah kanamisin, kapreomisin, amikasin, kuinolon, sikloserin, etionamid, para-amino salisilat (PAS) (Kemenkes 2011a; Kemenkes 2011b)

Isoniazid berkhasiat tuberkulosis paling kuat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (dalam fase istirahat) dan bersifat bakterisid terhadap basil yang sedang tumbuh pesat (Tjay dan Rahardja 2007). Isoniazid secara *in vitro* memiliki kadar hambat minimum sekitar 0,025-0,05 µg/mL (Istiantoro dan Setiabudy, diacu dalam Stella 2011 2007). Dosis dewasa isoniazid 300 mg per hari (5-10 mg/kg/BB) (Dipiro 2005). Isoniazid akan mencapai kadar plasma puncak dalam 1-2 jam sesudah pemberian dosis peroral 300 mg menghasilkan konsentrasi plasma puncak 3-5 µg/ml (Katzung 2005, diacu dalam Stella 2011). Kecepatan proses asetilasi yang memengaruhi kadar obat dalam plasma dan waktu paruhnya tergantung dari banyaknya asetiltransferase yang pada masing-masing orang berbeda secara genetik (Tjay dan Rahardja 2007).

Darah lengkap berisi unsur-unsur seluler yang terdiri dari sel darah merah, sel darah putih, platelet, dan berbagai macam protein lain seperti albumin dan globulin. Secara umum, serum atau plasma digunakan untuk pengukuran obat. Plasma diperoleh dari darah yang telah ditambahkan antikoagulan seperti heparin, kemudian disentrifugasi, supernatannya inilah yang disebut plasma (Shargel 1941). Parameter farmakokinetik diperoleh berdasar data penetapan kadar obat / metabolitnya dalam cairan hayati, dengan kata lain konsentrasi obat merupakan unsur penting dalam penentuan farmakokinetik individual/populasi. Konsentrasi obat dapat ditentukan dalam berbagai cairan hayati seperti, darah, urine, saliva, dan juga air susu ibu (Shargel *et al.* 2012).

Penetapan kadar menggunakan prosedur baku dan dengan mempertimbangkan penggunaan metode yang baik, seperti akurasi, ketelitian dan perolehan kembali serta sensitivitas dan selektivitas yang tinggi (Ritscel & Kearns 2009). Oleh karena itu, digunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang menurut Farmakope Edisi IV adalah metode pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi menggunakan teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi dan detektor yang sensitif (Depkes 1995).

H. Hipotesis

Berdasarkan pada permasalahan yang ada dapat diambil kesimpulan untuk menyusun hipotesis dalam penelitian ini sebagai berikut:

Pertama, kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis setelah 2 jam minum obat adalah 3-5 $\mu\text{g/ml}$.

Kedua, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar puncak INH setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori dengan kadar INH terukur dalam plasma darah pasien tuberkulosis.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional dengan pengumpulan data secara prospektif.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa Puskesmas di Kabupaten X pada bulan Desember 2016-Juli 2017 dan Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6 pasien tuberkulosis (TBC) dengan pengobatan tahap lanjut.. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasma darah pasien dengan pengobatan OAT sesuai kriteria inklusi di beberapa Puskesmas di Kabupaten X. Sampel ditentukan berdasar kriteri inklusi dan eksklusi.

1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi adalah prasyarat umum yang harus dipenuhi oleh obyek agar datanya dapat dipergunakan untuk penelitian. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah:

- a. Seluruh pasien tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut di beberapa Puskesmas Kabupaten X.
- b. Pasien tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut yang mengonsumsi Isoniazid.
- c. Pasien tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut dengan hasil laboratorium BTA positif, BTA negatif – foto toraks positif dan TB ekstra paru.
- d. Pasien yang bersedia menjadi responden pada penelitian

2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi adalah prasyarat khusus yang harus dimiliki obyek yang telah memenuhi kriteria inklusi agar datanya tidak dapat dipergunakan untuk penelitian. Kriteria eksklusi pada penelitian ini meliputi:

- a. Pasien tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut yang tidak rutin atau berhenti dalam terapi Isoniazid
- b. Pasien yang mengundurkan diri selama mengikuti penelitian

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah sampel darah pasien tuberkulosis. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama, sampel darah pasien tuberkulosis. Variabel utama kedua, kadar INH dalam plasma darah. Variabel utama ketiga, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) untuk analisis kualitatif dan kuantitatif Isoniazid.

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu, variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel darah pasien tuberkulosis.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis yang diukur menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat dilanjutkan atau diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah pasien tuberkulosis, kemampuan

peneliti dalam melakukan penelitian, kemurnian bahan pembanding, serta alat yang digunakan dalam laboratorium.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, sampel darah pasien tuberkulosis. Kedua, kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis. Parameter yang dilihat kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis yang dihitung dengan persamaan regresi linier dari konsentrasi kurva kalibrasi dengan luas area puncak dari INH.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

a. Alat yang Digunakan untuk Pengambilan Data Pasien

Lembar Rekam Medis (digunakan untuk mendapatkan data primer dari responden tentang riwayat pengobatan, penyakit penyerta, dan hal terkait lainnya)

b. Alat yang Digunakan untuk Proses Pengukuran Kadar Isoniazid

Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu) dengan pompa (LC-20 AD), injektor manual, kolom C₁₈ (Shimpack® 4,5 µm: 150 x 4,6 mm), detektor UV (SPD-20A), dengan pengolah data pada komputer CBM-102), spektrofotometer UV-VIS (Thermo); syringe, timbangan analitik (Ohaus); penyaring eluen (Whatman); penghilang gas (Elmasonic S30H); sentrifugator (Hettick EBA 200); vortex (Stuart Scientific); mikropipet (Socorex); pipet; dan alat-alat gelas.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan baku dan fase gerak untuk Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

2.1. Bahan baku

Baku Isoniazid, aqua bidestilata, asetonitril, methanol, kalium dihidrogen fosfat, EDTA. trietilamin, sampel plasma darah pasien tuberkulosis tahap lanjut, dan Baku Rifampisin.

2.2. Fase gerak dan larutan baku

a. Fase Gerak Larutan Kalium Dihidrogen Fosfat 15 mmol pH 6,2-asetonitril (99:1)

Dicampur 500 mL larutan KH_2PO_4 10 mmol pH 6,2 yang telah diatur dengan trietilamin (TEA) dengan 5 mL asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak disaring melalui membran 0,45 μm dan dilakukan proses penghilangan gas.

b. Larutan Baku Isoniazid 303 $\mu\text{g/ml}$ (Untuk pengukuran λ optimum)

Senyawa baku Isoniazid ditimbang dengan seksama sebanyak 7,58 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukuran 25 mL. Larutkan dengan aquabidest, kemudian tambahkan sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan yang mengandung Isoniazid dengan konsentrasi 303 $\mu\text{g/mL}$.

c. Larutan Baku Isoniazid 100 $\mu\text{g/ml}$ (Untuk kurva kalibrasi)

Senyawa baku Isoniazid ditimbang dengan seksama sebanyak 5 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukuran 50 mL. Larutkan dengan aquabidest, kemudian tambahkan sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan yang mengandung Isoniazid dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$.

d. Larutan Baku Isoniazid 300 $\mu\text{g/ml}$ (Untuk uji *In Vitro*)

Senyawa Isoniazid ditimbang dengan seksama sebanyak 7,5 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukuran 25 mL. Larutkan dengan aquabidest, kemudian tambahkan sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan yang mengandung Isoniazid dengan konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$.

e. Larutan Baku Rifampisin 10 $\mu\text{g/ml}$

Senyawa baku Isoniazid ditimbang dengan seksama sebanyak 0,5 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukuran 25 mL. Larutkan dengan aquabidest, kemudian tambahkan sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan yang mengandung Rifampisin dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ML}$

F. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan Data Pasien

Dilakukan pengumpulan data pasien yang memenuhi kriteria inklusi diambil dari data rekam medis pasien tuberkulosis pengobatan tahap lanjut di beberapa Puskesmas Kabupaten X.

2. Penetapan Panjang Gelombang Optimum Analisis

Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan alat spektrofotometer UV-Vis untuk melihat pada panjang gelombang berapa Isoniazid dapat terbaca (Yustisia 2015). Dibuat larutan baku INH 303 µg/ml diencerkan menjadi 10 µg/ml dan ditentukan nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis. Nilai panjang gelombang Isoniazid yang optimum dipilih untuk dilakukan analisis.

3. Pembuatan Fase Gerak (KH₂PO₄ 15 mmol pH 6,2 : Asetonitril 99:1)

Ditimbang 1,0205 gram Kalium dihidrogen fosfat, dilarutkan dalam 495 ml aquabidest. Kemudian ditetaskan trietilamin (TEA) hingga pH 6,2. Kemudian ditambahkan asetonitril 5 ml., lalu dihomogenkan. Dilakukan penghilangan gas.

4. Optimasi Kondisi Analisis INH

4.1. Pemilihan Perbandingan Komponen Fase Gerak

Larutan baku Isoniazid konsentrasi 303 µg/mL dilakukan pengenceran hingga 10 µg/ml, lalu disuntikkan sebanyak 20 µL ke KCKT dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2-asetonitril (97:3) sebagai kondisi awal. Selanjutnya disuntikkan 20 mL larutan ke KCKT dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) sebagai kondisi awal. Dicatat dan dibandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh

4.2. Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak

Larutan baku yang mengandung Isoniazid dengan konsentrasi 303 µg/mL dilakukan pengenceran hingga 10 µg/ml, lalu disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam 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, dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh.

4.3. Pemilihan Molaritas Kalium Dihidrogen Fosfat

Dilakukan variasi molaritas Kalium Dihidrogen Fosfat sebesar 5 mmol, 10 mmol, dan 15 mmol. Larutan baku yang mengandung Isoniazid dengan konsentrasi 303 µg/mL dilakukan pengenceran hingga 10 µg/ml, lalu disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat

dan dibandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan (T_f) yang diperoleh.

5. Preparasi larutan INH dalam Plasma Darah Plasebo

Sampel darah plasebo disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan disimpan pada tabung reaksi. Kemudian larutan INH 300 $\mu\text{g/ml}$ yang telah diencerkan menjadi 50 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 500 μg dicampurkan dengan plasma darah plasebo tersebut. Lalu ditambahkan asetonitril untuk mendeproteinasi dengan perbandingan 1:1 (v/v) sehingga masing-masing diambil 500 μl . Kemudian campuran tersebut divortex selama 30 detik dan disentrifuge dengan kecepatan 3600 rpm selama 5 menit. Beningan diambil dan disaring dengan penyaring PTFE 0,2 μm .

6. Validasi Metode Analisis INH

6.1. Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/Uji Selektivitas

Dilakukan preparasi larutan baku INH dalam plasma darah plasebo. Diamati puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu. Pengujian dilakukan terhadap plasma plasebo yang berasal dari 1 sumber probandus sehat.

6.2. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas

Dibuat larutan baku INH 100 $\mu\text{g/ml}$, kemudian diencerkan menjadi tujuh konsentrasi terpilih yaitu 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya disuntikkan sebanyak 20 μL masing-masing larutan tersebut ke KCKT pada kondisi terpilih. Diamati kromatogram dan waktu retensinya. Masing-masing direplikasi 3 kali. Setelah itu didapatkan persamaan regresi linear $y=a+bx$ dari konsentrasi(x) dan luas area(y) dari masing-masing konsentrasi. Penentuan linearitas kurva kalibrasi ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r^2) yang memenuhi syarat berdasarkan teori.

6.3. Penghitungan *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)*

Disiapkan kurva kalibrasi Isoniazid pada tujuh konsentrasi terpilih yaitu 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20 μL masing-masing konsentrasi tersebut disuntikkan ke KCKT pada kondisi terpilih. Dihitung nilai LOD dan LOQ dari

data pengukuran. Untuk menghitung nilai LOD digunakan rumus $LOD = 3 \times \frac{Sb}{slope}$ dan untuk menghitung nilai LOQ menggunakan rumus $LOQ = 10 \times \frac{Sb}{slope}$.

6.4. Uji Akurasi dan Perolehan Kembali

Larutan Isoniazid dengan konsentrasi rendah 1 µg/mL, sedang 4 µg/mL, dan tinggi 7 µg/mL disiapkan. Kemudian sebanyak 20 µL pada masing-masing larutan tersebut disuntikan ke KCKT pada kondisi terpilih.

Prosedur tersebut diulangi sebanyak 3 kali kemudian dihitung selisih nilai terukur dengan nilai sebenarnya dibandingkan dengan nilai sebenarnya (% *diff*), nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi, dan nilai perolehan kembali (% *recovery*) dari masing-masing konsentrasi.

6.5. Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan menyiapkan plasma yang mengandung Isoniazid pada konsentrasi rendah (1 µg/mL), sedang (4 µg/mL) dan tinggi (7 µg/mL). Selanjutnya disuntikkan sebanyak 20 µL pada masing-masing konsentrasi ke KCKT pada kondisi terpilih. Dilakukan pengulangan prosedur di atas sebanyak 3 kali secara intra hari dan antar hari. Kemudian dilakukan penghitungan Standar Deviasi (SD) dan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi.

7. Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Darah Plasebo (*In Vitro*)

Larutan Baku INH 300 µg/ml diencerkan menjadi 50 µg/ml, kemudian diambil 500 µg/ml dicampurkan dalam plasma darah plasebo yang telah dipreparasi. Selanjutnya disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Diamati kromatogram yang terbentuk dan waktu retensinya. Kemudian dilakukan penghitungan kadar obat dalam plasma pasien TBC tahap lanjut dengan regresi linear kurva kalibrasi.

8. Pengambilan Sampel Darah Pasien TBC

Pengambilan sampel plasma darah pasien dilakukan dengan cara mengambil dari vena cubiti lengan kiri sebanyak 3 ml setelah 2 jam minum obat INH untuk dilakukan pemeriksaan kadar Isoniazid dalam darah yang dilakukan oleh tenaga medis.

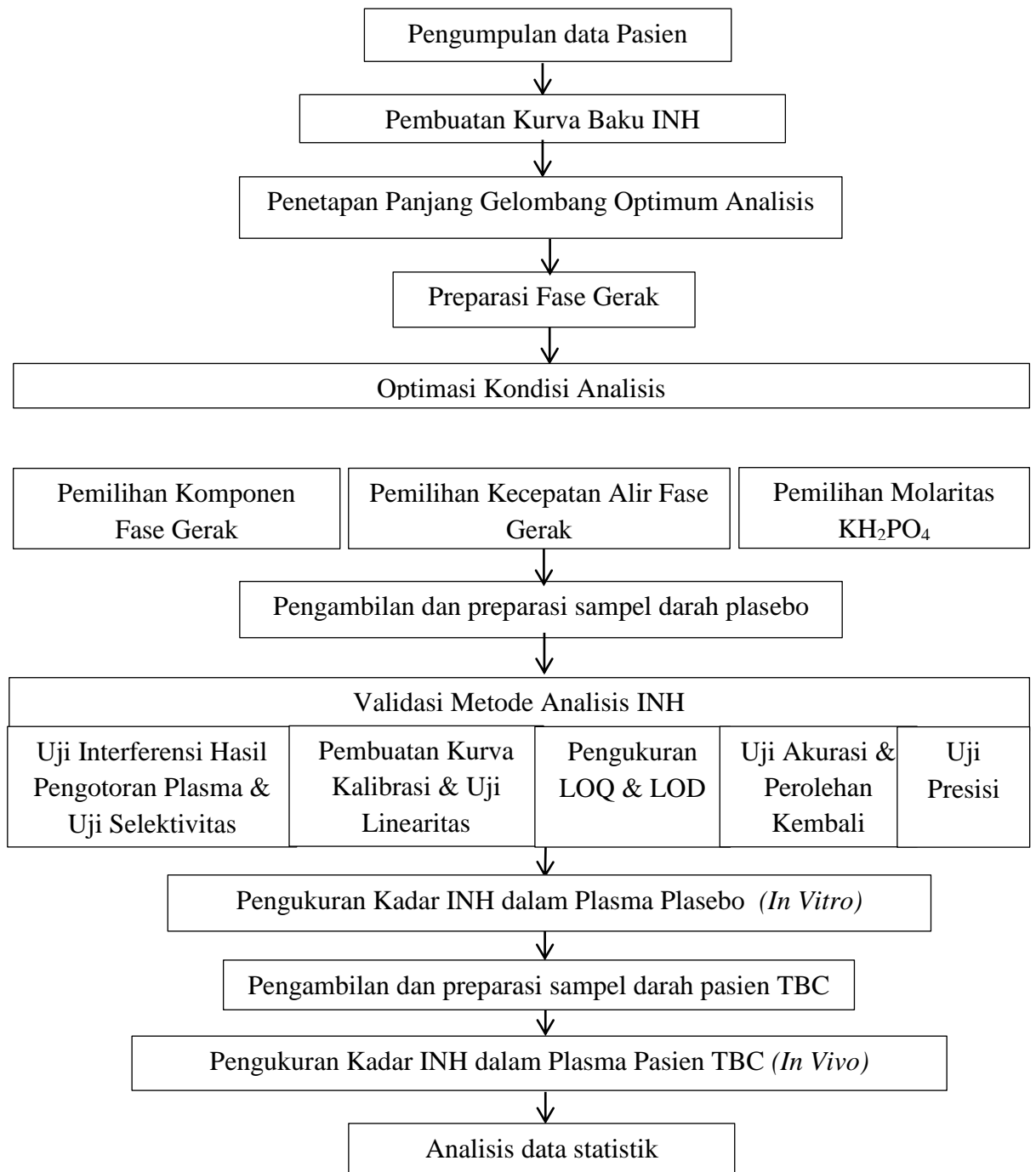
9. Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Pasien TBC (*In Vivo*)

Dilakukan pengambilan darah sebanyak 3 ml pada 2 jam setelah minum INH, lalu ditambahkan EDTA untuk mencegah kelisisan. Dilakukan penyimpanan pada pendingin dengan suhu $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, diambil supernatannya. Lalu dilakukan deproteinasi dengan penambahan asetonitril perbandingannya 1:1(v/v) sehingga masing-masing diambil 200 μl , kemudian dicampurkan dengan vortex selama 30 detik dan disentrifuge pada kecepatan 3600 rpm selama 5 menit.. Supernatan diambil dan disaring dengan penyaring PTFE 0,2 μm . Disuntikkan sebanyak 20 μl ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Diamati kromatogram yang terbentuk dan waktu retensinya Kemudian dilakukan penghitungan kadar obat dalam plasma pasien TBC tahap lanjut dengan regresi linear kurva kalibrasi.

10. Analisis Data

Analisis data menggunakan perangkat lunak SPSS *Statistics* 17.0. Uji statistik *Kolmogorov-Smirnov* digunakan untuk melihat distribusi data kadar INH terukur dalam plasma darah pasien tuberkulosis. Kemudian, digunakan *One Sample t-test* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar puncak INH setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori (3-5 $\mu\text{g/ml}$) dengan kadar terukur dalam plasma darah pasien tuberkulosis dilakukan analisis data statistik. Hipotesis diterima(H_0) jika nilai probabilitas $>0,05$ dan hipotesis ditolak(H_1) jika nilai probabilitas $<0,05$.

G. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 2. Kerangka Konsep Penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Pengambilan Sampel Darah

Sampel yang diteliti adalah plasma darah dari 9 pasien TBC sedang yang menjalani pengobatan tuberkulosis tahap lanjut di beberapa Puskesmas di Kabupaten X. Waktu pengambilan darah adalah 2 jam setelah meminum OAT.

2. Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Pada penelitian ini, penetapan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan baku INH 303 $\mu\text{g/ml}$ yang diencerkan menjadi 10 $\mu\text{g/ml}$ ditentukan panjang gelombang optimumnya pada serapan 200-400 nm. Lampiran Gambar 5.1 menunjukkan panjang gelombang optimum untuk INH adalah 230 nm.

3. Optimasi Kondisi Analisis INH

3.1. Pemilihan Perbandingan Komponen Fase Gerak

Dilakukan pemilihan metode analisis terbaik untuk analisis INH. Terdapat dua metode, yaitu fase gerak kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2-asetonitril (97:3) dan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1). Laju alir yang digunakan adalah 1,0 ml/menit.

Tabel 1 menunjukkan metode yang terpilih adalah metode yang kedua, yaitu fase gerak dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2-asetonitril (99:1) untuk analisis INH dalam plasma darah.

Tabel 1. Pemilihan Perbandingan Komponen Fase Gerak

Pembandingan Komponen KH_2PO_4 dan Asetonitril	Waktu Retensi (menit)	N	HETP	Tf
97:3	4,260333	15430,81	0,000972	1,640667
99:1	6,160667	18411,25	0,000815	2,013667

Sumber: Hasil penelitian

Metode kedua dipilih karena memiliki nilai N yang lebih besar, dalam Johnson dan Stevenson (1991) dinyatakan kolom yang baik mempunyai HETP yang kecil dan N yang besar. Metode kedua tetap dipilih, meskipun waktu retensi lebih lama dari metode pertama dan faktor ikutan(Tf) >1 , karena menurut teori Tf yang baik ≤ 1 (Gandjar dan Rohman 2007, diacu dalam Fentimalia 2010). Hal ini

dikarenakan apabila menggunakan metode pertama dikhawatirkan saat pembacaan kromatogram ditemui kesulitan, karena biasanya *peak* pengotor muncul pada menit <6. Oleh karena itu, pada penelitian ini diperlukan metode yang memiliki waktu retensi yang efisien. Metode kedua dipilih karena dianggap memberikan pemisahan yang baik antara pengotor dengan INH, nilai N, HETP, dan Tf yang baik. Kromatogram perbandingan komponen fase gerak pertama (93:7) dapat dilihat pada Lampiran Gambar 5.3, dan fase gerak (99:1) dapat dilihat pada Lampiran Gambar 5.2.

3.2. Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak

Kecepatan alir fase gerak divariasikan menjadi tiga, untuk awal digunakan 1,0 ml/menit kemudian 0,8 ml/menit dan 1,2 ml/menit. Tabel 2 menunjukkan hasil pemilihan kecepatan alir fase gerak.

Tabel 2. Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak

Kecepatan Alir(ml/menit)	Waktu Retensi (menit)	N	HETP	Tf
0,8	8,787	19494,8	0,000769	2,795
1	6,892	18573,901	0,000808	1,069
1,2	5,875	16668,038	0,0009	2,069

Sumber: Hasil Penelitian

Kecepatan alir fase gerak 1,0 ml/menit memiliki nilai N yang lebih besar dibanding kecepatan alir 1,2 ml/menit, dalam Johnson dan Stevenson (1991) dinyatakan kolom yang baik mempunyai HETP yang kecil dan N yang besar. Kecepatan 0,8 ml/menit dan 1,2 ml/menit dianggap tidak optimal, karena memiliki Tf jauh dari nilai standar yaitu >1. Kecepatan alir terpilih adalah 1,0 ml/menit dipilih memiliki waktu pemisahan yang baik, nilai N, HETP, dan Tf yang baik. Kromatogram pemilihan kecepatan alir fase gerak dapat dilihat pada Lampiran Gambar 5.2, 5.4 dan 5.5.

3.3. Pemilihan Molaritas Kalium Dihidrogen Fosfat

Molaritas Kalium Dihidrogen Fosfat divariasikan menjadi tiga, untuk awal dibuat 10 mmol kemudian 5 mmol dan 15 mmol. Tabel 3 menunjukkan hasil pemilihan molaritas Kalium Dihidrogen Fosfat.

Tabel 3. Pemilihan Molaritas Kalium Dihidrogen Fosfat

Molaritas(mmol)	Waktu Retensi (menit)	N	HETP	Tf
5	14,43067	27436,97	0,000547	3,238333
10	15,581	27172,22	0,000552	3,432
15	14,03633	28803,91	0,000521	3,179

Sumber: Hasil Penelitian

Molaritas kalium dihidrogen fosfat 15 mmol memiliki nilai N yang paling besar dibandingkan molaritas yang lain, sesuai dalam Johnson dan Stevenson (1991) dinyatakan kolom yang baik mempunyai HETP yang kecil dan N yang besar. Nilai Tf ketiga molaritas memiliki nilai >1 , akan tetapi dipilih yang paling mendekati syarat sesuai Gandjar dan Rohman(2007) yaitu yang ≤ 1 . Molaritas kalium dihidrogen fosfat yang dipilih adalah 15 mmol, karena memiliki kepolaran yang lebih tinggi yang dianggap dapat memberikan nilai N, HETP, dan TF yang baik. Kromatogram pemilihan molaritas kalium dihidrogen fosfat dapat dilihat pada Lampiran Gambar 5.2, 5.6 dan 5.7

Jadi, metode atau kondisi analisis yang terpilih untuk analisis INH dalam plasma darah pasien TBC adalah Fase Gerak Kalium Dihidrogen Fosfat 15 mmol pH 6,2 – Asetonitril 99:1 dengan laju alir 1,0 ml/menit.

4. Preparasi larutan baku INH dalam Plasma Darah Plasebo

Sampel darah plasebo didapatkan dari satu sumber probandus normal yang tidak mengonsumsi INH. Digunakan kurva baku INH konsentrasi 300 μ g/ml . Asetonitril dipilih untuk deproteinasi karena dapat memisahkan plasma dengan baik dibandingkan TCA, karena sesuai dengan kromatogram pada Lampiran Gambar 5.9 yang menunjukkan hasil deproteinasi dengan TCA didapati lebih banyak pengotor pada waktu retensi biasa INH terbaca. Hal ini juga bersesuaian dengan Lestari (2014), penambahan larutan organik seperti asetonitril pada larutan protein akan menurunkan KD (Konstanta Dielektrik) pelarut/air yang meningkatkan tarikan antara molekul-molekul bermuatan dan memfasilitasi interaksi elektrostatis. Pelarut organik akan mengganti beberapa molekul air di sekitar daerah hidrofob dari permukaan protein yang berasosiasi dengan protein, maka kemudian akan menurunkan konsentrasi air dalam larutan dan kelarutan protein akan turun diikuti proses pengendapan.

5. Validasi Metode Analisis INH

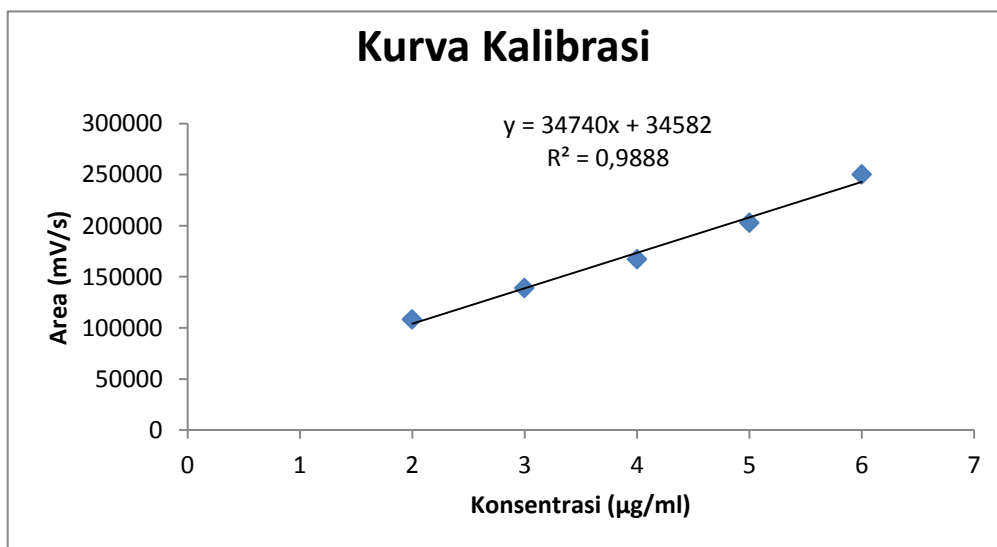
5.1. Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/Uji Selektivitas

Plasma plasebo yang telah dipreparasi disuntikan ke alat KCKT dengan kondisi terpilih sebanyak 20 µl dan dilihat pada waktu retensi tersebut. Kemudian dilakukan pembacaan kromatogram pengotoran plasma. Dalam Lampiran Gambar 5.9.a, puncak pengotor plasma muncul pada waktu retensi 0,025-4,139 menit. Dalam Lampiran Gambar 5.10 menunjukkan INH muncul pada menit 6,755 pada campuran larutan INH baku dengan plasma plasebo. Hasil ini menunjukkan bahwa plasma darah tidak mengganggu pembacaan INH pada metode ini.

5.2. Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas

Penetapan linearitas kurva kalibrasi INH dilakukan dengan mengukur luas area puncak, kemudian dihubungkan dengan konsentrasi. Kurva kalibrasi INH dibuat pada 7 konsentrasi, yaitu 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 µg/ml dan didapatkan persamaan regresi yaitu $y = 34740,4333x + 34582,267$ yang dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan penelitian ini, metode ini memiliki linearitas yang baik dengan nilai koefisien korelasi (r^2) = 0,988. Nilai r memenuhi standar linearitas yang ditetapkan yaitu lebih besar dari 0,95 (Shargel 1988, diacu dalam Lestari 1994). Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Lampiran Tabel 6.2.

Gambar 3. Kurva Kalibrasi INH



5.3. Pengukuran *Limit Of Detection (LOD)* dan *Limit Of Quantification (LOQ)*

Data kurva kalibrasi digunakan untuk menghitung nilai LOD dan LOQ. LOD merupakan batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOQ merupakan batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi yang terpilih. Hal itu dapat diartikan bahwa semakin rendah nilai LOQ, maka semakin sensitif metode yang digunakan.

Pada tahap validasi ini, dibuat kurva kalibrasi untuk INH pada konsentrasi yaitu 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 $\mu\text{g/mL}$. Didapatkan nilai batas deteksi (LOD) sebesar 0,582 $\mu\text{g/ml}$ dan batas kuantifikasi (LOQ) sebesar 1,941 $\mu\text{g/ml}$. Secara teoritis, INH 300 mg secara *in vivo* memiliki kadar puncak sekitar 3-5 $\mu\text{g/m}$ (Katzung 2005, diacu dalam Stella 2011). Nilai LOQ yang didapat menunjukkan bahwa metode ini dapat digunakan untuk analisis untuk konsentrasi INH $>1,941 \mu\text{g/ml}$. Penghitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada Lampiran Tabel 6.3.

5.4. Uji Akurasi dan Perolehan Kembali

Pada uji akurasi dan perolehan kembali, digunakan 3 konsentrasi yaitu rendah, sedang, dan tinggi, yaitu 1 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, dan 7 $\mu\text{g/ml}$. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi.

Tabel 4. Uji Akurasi dan Perolehan Kembali

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% diff (%)	% perolehan kembali (%)
1	23,325	123,3251
4	-12,937	87,06263
7	7,748	107,7477
Syarat	<15% (Harmita 2004)	80-110% (Huber 2007)
Rata-rata	6,045	106,045

Tabel 4 dapat dilihat, metode yang digunakan memiliki nilai % *diff* untuk konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, dan 7 $\mu\text{g/ml}$ secara berurutan diperoleh nilai sebesar 23,325%, -12,937%, dan 7,748%. Rata-rata % *diff* untuk uji presisi sebesar 6,045%. Hanya pada konsentrasi rendah yang tidak memenuhi syarat <15%

(Harmita 2004, diacu dalam Lestari 2014), akantetapi jika melihat rata-rata % *diff* ketiga konsentrasi sudah memenuhi syarat tersebut.

Tabel 4 juga menunjukkan, nilai perolehan kembali untuk konsentrasi 1 µg/ml, 4 µg/ml, dan 7 µg/ml secara berurutan diperoleh nilai sebesar 123,325%, 87,063%, dan 107,748%. Rata-rata nilai perolehan kembali sebesar 106,045%. Hanya pada konsentrasi rendah yang tidak memenuhi syarat akurasi dalam Huber(2007) yaitu untuk sampel dengan konsentrasi 100 ng/ml-10 µg/ml memiliki persen perolehan kembali sebesar 80-110%. Pada konsentrasi rendah(1 µg/ml) nilai % *diff* dan perolehan kembali tidak memenuhi syarat, kemungkinan diakibatkan karena pengenceran yang tidak tepat. Data uji akurasi dan perolehan kembali secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran Tabel 6.4.

5.5. Uji Presisi

Pengulangan/presisi menyatakan keterulangan, jika analisis dilakukan berulang maka perbedaan hasil yang didapat tidak melebihi syarat uji presisi (Huber 2007, diacu dalam Lestari 2014). Dilakukan analisis pada masing-masing konsentrasi sebanyak tiga kali pada hari yang sama (intra hari) dan pada hari berikutnya (antar hari). Dari uji presisi ini, didapatkan nilai simpangan baku relatif(RSD) atau koefisien variasi(KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi antara pada hari ke-1 masing-masing sebesar 5,213%, 7,362% dan 0,932%. Untuk hari ke-2, nilai RSD/KV yang didapat sebesar 2,104%, 3,957% dan 1,478%. Jika dilihat dari hasil uji presisi hari ke-1 dan ke-2, maka rata-rata RSD untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi masing-masing sebesar 1,466%, 2,412% dan 0,615%. Rata-rata RSD uji presisi yang diperoleh sebesar 1,498%.

Tabel 5. Uji Presisi

Konsentrasi (µg/ml)	Area Terukur (mV/s)	Intra Hari		Antar Hari		Syarat RSD
		SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	
1	Hari 1	76705,33333	3998,563	5,213	1119,953	1,46570563
	Hari 2	76115,66667	1601,607	2,104		
4	Hari 1	159021,6667	11706,663	7,362	3936,137	2,41235615
	Hari 2	167309,7	6620,687	3,957		
7	Hari 1	307600	2865,797	0,932	1872,735	0,61452761
	Hari 2	301887,6667	4463,317	1,478		
Rata-rata					2309,608	1,498

Dari data uji presisi antar hari, diketahui ketiga konsentrasi memenuhi syarat presisi secara teoritis yaitu % RSD pada larutan yang mengandung zat aktif dengan konsentrasi $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ adalah $<5,3\%$ (Huber 2007, diacu dalam Nugraheni dan Anggoro 2016). Data uji presisi secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran Tabel 6.5.

6. Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Darah Plasebo (*In Vitro*)

Pengukuran secara *in vitro*, dilakukan untuk melihat gambaran kadar INH dalam cairan hayati yang diekstraksi dengan larutan kurva baku INH pada kondisi analisis terpilih. Kadar dihitung dengan persamaan dari regresi linear kurva kalibrasi $y = 34740,433x + 34582,267$. Diperoleh rerata kadar *in vitro* sebesar $6,483 \mu\text{g/ml}$.

Tabel 6. Kadar *In Vitro* INH dalam Plasma Plasebo

Replikasi	Waktu Retensi(menit)	Area (mV/s)	kadar INH dalam plasma plasebo ($\mu\text{g/ml}$)
1	6,788	148387	3,276
2	6,792	158397	3,564
3	6,784	305172	7,789
4	6,755	330708	8,524
5	6,759	356326	9,261
Rerata	6,7756	259798	6,483

Sumber: Hasil Penelitian

Dalam Tabel 6, dapat dilihat dari lima kali replikasi kadarnya tidak stabil, hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, misalnya: faktor pengenceran dan ekstraksi yang tidak tepat, adanya gelembung gas pada larutan serta kondisi pompa yang sudah usang yang menyebabkan tekanan yang tidak stabil dan berpengaruh pada pembacaan hasil kromatogram.

7. Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Pasien TBC (*In Vivo*)

Pasien tuberkulosis yang menjadi sampel penelitian ini menjalani pengobatan standart TBC Kategori 1 yang memiliki 2 tahap pengobatan, yaitu tahap intensif dan tahap lanjut. Pada tahap intensif, 2 bulan pertama pasien diberikan kombinasi obat INH, Rifampisin dan Ethambutol, dikonsumsi rutin setiap hari. Selanjutnya pada tahap lanjut, 4 bulan selanjutnya dalam seminggu mengonsumsi INH dan Rifampisin sebanyak 3 kali. Dalam penelitian ini,

dilakukan pengukuran kadar INH dalam plasma pasien TBC setelah pengobatan tahap lanjut. Selama pengobatan tahap lanjut, seluruh sampel penelitian selama seminggu 3 kali pasien mengkonsumsi rutin INH dalam dosis tunggal 5-10 mg/kg/BB (dosis maksimal 300 mg/hari) dan Rifampisin 10-20 mg/kg/BB (dosis maksimal 600 mg/hari).

Pengambilan sampel darah pasien TBC dilakukan oleh tenaga medis pada 2 jam setelah minum obat, untuk melihat kadar dalam plasma apakah telah mencapai *range* kadar puncak berdasar teori atau belum. Kadar INH dalam plasma darah pasien dihitung dengan persamaan dari regresi linear kurva kalibrasi $y = 34740,433x + 34582,267$. Preparasi dilakukan awalnya pada 12 sampel darah pasien, tetapi hanya 6 sampel yang dapat dilakukan pembacaan kromatogram ke KCKT, yaitu sampel 1, 3, 8, 9, 10, dan 11. Sampel-sampel yang tidak bisa dianalisis dengan KCKT, disebabkan karena preparasi yang gagal, kerusakan pada saat penyimpanan, dan tidak muncul puncak INH pada waktu retensi yang dibutuhkan sesuai validasi INH. Diperoleh rerata kadar INH dalam plasma darah 6 sampel pasien TBC sebesar 6,221 µg/ml.

Tabel 7. Kadar *In Vivo* INH dalam Plasma Pasien TBC

Sampel	Waktu Retensi (menit)	Area (mV/s)	Kadar INH dalam darah pasien TBC (µg/ml)
1	6,746	50622	0,462
3	8,506	51631	0,492
8	8,0665	529584,5	14,249
9	7,5045	536752	14,455
10	7,2515	289651,5	7,342
11	6,1125	45907,5	0,326
Rata-rata	7,3645	250691,4	6,221

Sumber: Hasil Penelitian

Tabel 7 menunjukkan kadar INH yang bervariasi. Seluruh sampel memiliki kadar puncak INH 2 jam setelah minum obat dalam plasma darah secara *in vivo* yang tidak masuk *range* teoritis (Katzung 2005, diacu dalam Stella 2011, diacu dalam Stella 2011) yaitu 3-5µg/ml. Kadar yang tinggi pada sampel 8, 9 dan 10, terjadi mungkin karena akumulasi kadar obat selama 6 bulan terakhir (2 bulan tahap intensif dan 4 bulan tahap lanjut), seperti yang pernah diteliti dalam Moussa *et al.* (2016) menyatakan, bahwa kadar INH yang tinggi pada pasien dengan ADR

dan tanpa ADR sering terjadi pada pengobatan tuberkulosis. Kondisi kadar yang tinggi melebihi *range* teoritis atau target tersebut juga pernah dibuktikan dalam Fentimalia(2010), didapatkan hasil pengukuran kadar INH dalam plasma pasien TBC menggunakan KCKT sebesar 6,9 µg/ml. Kemungkinan lain adalah pasien-pasien tersebut masuk kelompok *Slow Inactivator* atau yang secara genetik memiliki kecepatan rata-rata yang rendah untuk mengasetilasi enzim hepatic (*N acetyltransferase*), relatif kekurangan enzim *hepatic transferase*, memerlukan dosis lebih kecil dan mempunyai waktu paruh INH rata-rata $3,0 \pm 0,8$ jam (Arimbi 2003).

Kadar INH yang rendah pada sampel 1, 3 dan 11, kemungkinan disebabkan karena proses asetilasi INH yang cepat dalam hepar pada pasien. dengan kata lain pasien tersebut memiliki tipe asetilator cepat dimana enzim N-asetiltransferase lebih banyak terbentuk sehingga INH lebih cepat diekskresikan dalam bentuk asetilisoniazid. Selaras dengan Arimbi (2003), pada kelompok *Rapid Inactivator* atau yang secara genetik memiliki kecepatan rata-rata yang lebih tinggi untuk mengasetilasi enzim hepatic (*N acetyltransferase*), relatif memiliki kelebihan enzim *hepatic transferase*, memerlukan dosis lebih besar dan mempunyai waktu paruh INH rata-rata $1,1 \pm 0,2$ jam.

Tjay dan Rahardja (2007) menyatakan bahwa kecepatan proses asetilasi memengaruhi kadar obat dalam plasma dan waktu paruhnya tergantung dari banyaknya asetiltransferase yang pada masing-masing orang berbeda secara genetik. Dalam Evans (1989, diacu dalam Moussa *et al.* 2016) juga dinyatakan, bahwa variabilitas konsentrasi INH dalam plasma yang besar dikaitkan dengan status asetilator pasien. Faktor makanan juga dapat memengaruhi kadar INH dalam plasma darah pasien. Isoniazid diabsorpsi dengan baik dalam gastrointestinal setelah pemberian per oral, sebanyak 10% terikat protein plasma, kemudian INH didistribusikan dengan cepat ke dalam cairan tubuh dan jaringan ke seluruh tubuh. Akan tetapi adanya makanan dapat menurunkan bioavaibilitasnya (Arimbi 2003).

Secara umum, hasil pengukuran kadar yang berbeda-beda tiap individu dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain kondisi asetilasi yang beragam

pada tiap individu dan faktor munculnya gelembung gas pada fase gerak yang menyebabkan terganggunya analisis pada KCKT.

8. Pengaruh Rifampisin dalam Pengukuran Kadar INH dalam Plasma

Secara teoritis dalam “*Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Tuberculosis*” yang diterbitkan Depkes(2006a), dinyatakan INH berinteraksi dengan Antikonvulsan, Parasetamol dan Karbamazepin (menyebabkan hepatotoksisitas), Antasida dan Adsorben (menurunkan absorpsi INH), Sikloserin (meningkatkan toksisitas SSP), Karbamazepin; Etosuksimid dan Diazepam (dihambat metabolismenya), Teofilin (peningkatan kadar), serta makanan (penurunan absorpsi INH). Tidak disebutkan berinteraksi dengan OAT lainnya. Dalam Vernon (2004, diacu dalam Prihatni *et al.* 2005) dinyatakan Rifampisin bekerja secara sinergis dengan INH. Hal ini yang mendasari tidak dilakukannya pengamatan terhadap pengaruh kadar Rifampisin dalam terhadap pengukuran kadar INH dalam plasma darah pasien.

Dalam penelitian Moussa *et al.* (2016), kadar INH 3 jam setelah minum OAT (INH, Rifampisin, Etambutol, dan Streptomisin) dalam pasien TBC sering terjadi peningkatan kadar melebihi kadar terapeutik yang ditetapkan berdasar teori (Compagnon *et al.* 2004) yaitu 1-2 mg/l, sedangkan kadar Rifampisin 3 jam sesudah minum OAT sudah sesuai dengan rentang terapeutik berdasar teori dalam Peloquin (2002) yaitu sekitar 8-24 mg/l. Hal ini menunjukkan, evaluasi kadar INH sangat diperlukan untuk penyesuaian dosis untuk mencegah resistensi maupun toksisitas pada organ hati pada pasien TBC.

Waktu retensi INH yang dipilih pada saat analisis kadar dalam plasma pasien TBC diyakini bukan waktu retensi dari Rifampisin. Alasannya karena ketika pembacaan larutan baku INH pada fase gerak terpilih muncul puncak pada menit 6,985, dapat dilihat pada Lampiran Gambar 5.8. Ketika validasi pada 7 konsentrasi *peak* INH muncul pada *range* menit 6,888-7,331, kromatogram dapat dilihat pada Lampiran Gambar 5.11. Ketika pembacaan pada larutan baku Rifampisin, yang menunjukkan tidak muncul sama sekali puncak pada menit-menit tersebut, kromatogram dapat dilihat pada Lampiran Gambar 5.14.a. Pembacaan dengan KCKT juga dilakukan pada campuran larutan baku INH dan

larutan baku Rifampisin pada kondisi terpilih, hasilnya muncul puncak pada menit ke 7,193 menit yang diyakini sebagai *peak* dari INH, kromatogram dapat dilihat pada Lampiran 5.14.b. Pada Tabel 7 juga dapat dilihat rata-rata pembacaan kadar INH pada plasma darah pasien TBC (*In Vivo*) muncul puncak pada waktu retensi 7,365 menit.

9. Gambaran Evaluasi *Outcome* Klinis Pasien Tuberkulosis

Untuk mendiagnosis penyakit tuberkulosis pada pasien yang dijadikan sampel penelitian ini, dilakukan pemeriksaan dari uji Bakteri Tahan Asam (BTA) dan foto toraks. Hal tersebut sudah tepat, karena dengan uji BTA melalui pemeriksaan dahak mikroskopis merupakan diagnosis utama. Pemeriksaan lain seperti foto toraks, biakan dan uji kepekaan dapat digunakan sebagai penunjang diagnosis sepanjang sesuai dengan indikasinya (Depkes 2006a). Tabel 8 menunjukkan, pemeriksaan BTA dan foto toraks di awal pengobatan 5 dari 6 pasien hasilnya positif, hanya pada pasien nomer 5 dengan hasil BTA negatif dan foto toraks positif.

Berdasarkan hasil pemeriksaan tersebut, pasien yang telah didiagnosis TBC harus menjalani pengobatan standart Kategori 1 (2HRZE/4H3R3). Kategori 1 ini dapat diberikan pada pasien TB paru BTA positif, TB paru BTA negatif foto toraks positif dan TB ekstra paru (Kemenkes 2011b). Penelitian ini hanya melihat atau mengevaluasi capaian kadar INH pada akhir tahap pengobatan lanjut, yaitu selama seminggu mengkonsumsi 3 kali INH dan Rifampisin, kedua obat tersebut dikonsumsi rutin selama 4 bulan. Evaluasi pada pengobatan TBC dilakukan untuk melihat apakah pengobatan TBC sudah tepat atau belum dan untuk mengetahui diperlukannya penyesuaian dosis atau tidak. Evaluasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, misalnya: Evaluasi Klinis (tiap 1 bulan); Bakteriologis/BTA (tiap 0-2-6/9 bulan), Radiologi (tiap 0-2-6/9 bulan), Efek Samping Obat secara Klinis; dan Keteraturan Berobat (PDPI 2006). Selaras dengan hal tersebut, dalam penelitian ini pada akhir pengobatan dilakukan evaluasi klinis, bakteriologis dan radiologi.

Pada akhir pengobatan tahap lanjut juga dilakukan evaluasi kadar INH dalam plasma darah 2 jam setelah minum OAT, apakah sudah memenuhi kadar

puncak target yang ditetapkan berdasar teori yaitu 3-5 $\mu\text{g/ml}$ atau belum. Beresuaian dengan Shargel (1988, diacu dalam Fentimalia 2010), bahwa pemantauan konsentrasi obat dalam darah atau plasma meyakinkan dosis yang telah diperhitungkan benar-benar telah melepaskan obat dalam plasma dalam kadar yang diperlukan untuk efek terapeutik.

Selaras dengan hal tersebut, jika kadar obat dalam darah di atas KTM maka bisa dilakukan evaluasi terhadap gejala toksisitas pasien (Karen 2011). Apabila kadar obat di bawah KEM, maka terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan seperti, kepatuhan pasien perlu dilihat apakah pasien sudah mengonsumsi obat dengan tepat waktu, mengingat obat memiliki durasi tertentu sehingga pasien harus mengonsumsi obat dalam jadwal tertentu agar konsentrasi obat dalam plasma tetap berada di daerah terapi (Herdwiani *et al.* 2016).

Tabel 8. Evaluasi *Outcome* Klinis Pasien Tuberkulosis

Sampel	Usia	Awal Pengobatan			Akhir Pengobatan			Gejala Klinis		Kadar INH ($\mu\text{g/ml}$)
		BB	BTA	FT	BB	BTA	FT	Demam Intermitten	Batuk	
1	45	40	+	+	45	-	-	-	-	0,462
3	27	46	+	+	49	-	-	-	+	0,491
5	50	50	-	+	55	-	-	-	-	14,249
9	37	46	+	+	47	-	-	-	-	14,455
10	44	40	+	+	45	+	+	-	+	7,342
11	44	39	+	+	40	-	-	-	-	0,326

Ket: (+) Positif, (-) Negatif, (BB) Berat Badan, (BTA) Bakteri Tahan Asam, (FT) Foto toraks.

Hasil evaluasi *outcome* klinis dilihat dari data rekam medis, Tabel 8 menunjukkan setelah 4 bulan pengobatan tahap lanjut, pada evaluasi gejala klinis seluruh pasien mengalami peningkatan berat badan (meskipun antar pasien berbeda-beda kenaikannya), seluruh pasien tidak mengalami demam dan hanya 2 pasien (nomer 3 dan 10) yang gejala batuk masih positif. Pada evaluasi bakteriologis/BTA dan radiologis/foto toraks, hanya pada pasien nomer 10 yang masih positif.

Pada pasien nomer 3 yang pemeriksaan gejala batuk masih positif, kadar INH dalam plasma darah sebesar 0,491 $\mu\text{g/ml}$, berada di bawah kadar puncak

target yang ditetapkan berdasar teoritis (Katzung 2005, diacu dalam Stella 2011) yaitu 3-5 $\mu\text{g/ml}$. Ditinjau dari usia pasien nomer 3 dan 1 memiliki jarak yang jauh (selisih 18 tahun), tetapi kadar INH dalam plasma darah berdekatan, hanya selisih 0,029 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan pada pasien nomer 5 yang evaluasi gejala klinis; BTA dan foto toraks di akhir pengobatan negatif semua, dengan jarak usia yang dekat dengan pasien nomer 1 (hanya selisih 5 tahun) kadar INH dalam plasma darahnya sebesar 14,249 $\mu\text{g/ml}$, lebih besar 30x dari pasien nomer 1. Selaras dengan itu, pasien nomer 10 yang usianya sama dengan pasien nomer 11(44 tahun), ditinjau dari hasil evaluasi gejala klinis; BTA dan foto toraks serta kadar INH dalam plasma darahnya, kedua pasien tidak memiliki *outcome* klinis yang sama di akhir pengobatan. Hal ini menunjukkan, dalam penelitian ini faktor usia tidak dapat menjadi patokan kadar INH yang juga sama dalam plasma darah. Usia juga tidak dijadikan kriteria inklusi dalam penelitian ini dan pengelompokan sampel berdasarkan usia juga tidak dilakukan karena sampel dipilih secara acak.

Pada pasien nomer 9 yang dari evaluasi gejala klinis; BTA dan foto toraks di akhir pengobatan sudah negatif semua, memiliki kadar puncak INH dalam plasma darah yang melebihi target, yaitu sebesar 14,455 $\mu\text{g/ml}$. Ditinjau dari hasil evaluasi gejala klinis; BTA dan foto toraks, pasien nomer 9 semua sudah negatif sedangkan pasien nomer 10 semua masih positif, namun kadarnya sama-sama melebihi kadar puncak target yang ditetapkan berdasar teori. Hal tersebut menunjukkan, dalam penelitian ini faktor kadar yang sama-sama melebihi *range* teoritis tidak dapat menjadi patokan hasil *outcome* klinis yang juga sama.

10. Analisis Data

Berdasarkan analisis statistik, kadar INH terukur pada pasien TBC yang diuji dengan Kolmogorov-Smirnov, memiliki nilai probabilitas Sig. = 0,223 > 0,05 yang berarti data terdistribusi normal. Kemudian dari hasil analisis statistik dengan *One Sample t-test*, memiliki nilai probabilitas Sig. = 0,008. Karena probabilitas di bawah 0,05 maka H_0 ditolak, dengan kesimpulan bahwa terdapat perbedaan antara kadar INH target dengan kadar INH terukur pada plasma pasien TBC. Tabel analisis data statistik secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 6.9.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dalam penelitian “Pengukuran Kadar Isoniazid dalam Plasma Darah Pasien TBC di beberapa Puskesmas Kabupaten X” ini, dapat disimpulkan bahwa:

3. Hasil pengukuran Kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis setelah 2 jam minum obat adalah tidak semua sampel mencapai kadar puncak yang dibutuhkan berdasar teori.
4. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar puncak INH setelah 2 jam minum obat yang dibutuhkan berdasar teori dengan kadar INH terukur dalam plasma darah pasien tuberkulosis.

B. Saran

Saran dalam penelitian ini adalah:

1. Perlunya optimasi kondisi analisis Isoniazid dengan mengembangkan variasi parameter derajat keasaman(pH).
2. Perlunya meneliti pengaruh usia terhadap pengukuran kadar INH dalam plasma darah pasien tuberkulosis.
3. Perlunya pengembangan penelitian yang melibatkan pasien yang lebih banyak pada seluruh Puskesmas di Kabupaten X, agar memberikan gambaran secara luas kondisi efikasi pengobatan tahap lanjut tuberkulosis.
4. Perlunya pengembangan penelitian pengukuran kadar INH dalam plasma darah pasien pengobatan TBC Kategori 2 (2HRZES/HRZE/5HRE) dan Kategori *Multi-Drug Resistent*(MDR) di Kabupaten X.

DAFTAR PUSTAKA

- [Depkes]. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi II*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes]. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes]. 2000. Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis. Jakarta : Depkes RI. p:7-41.
- [Depkes]. 2005. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. Pharmaceutical Care untuk Penyakit Tuberkulosis. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes]. 2006a. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik Ditjen Bina Kefarmasian dan Alkes. Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Tuberculosis. Jakarta: Depkes RI.
- [Depkes]. 2006b. Pedoman Penanggulangan Tuberkulosis. Edisi 2. Jakarta : Depkes RI. p:7-25.
- [Depkes]. 2007. Pedoman Penanggulangan Tuberkulosis. Edisi 2. Jakarta : Depkes RI. p:3.
- [Depkes]. 2008a. Lembar Fakta Tuberkulosis. Disampaikan dalam Rangka Peringatan Hari TB Sedunia-24 Maret 2008. Jakarta.
- [Depkes]. 2008b. Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis. Jakarta: Depkes RI. p.1-72.
- [Dinkes Bantul]. 2016. Dinas Kesehatan Kabupaten Bantul. Profil Kesehatan Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.
- [FDA]. 2001. Guidance for Industry: bioanalytical method validation. 1-20. [18 Juli 2017].
- [Kemenkes]. 2011a. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Strategi Nasional Pengendalian TB di Indonesia 2010-2014. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- [Kemenkes]. 2011b. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta: Bakti Husada.

- [Kemenkes]. 2015. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- [PDPI]. 1998. Pedoman Penatalaksanaan TB Paru. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia.
- [PDPI]. 2006. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan Tuberkulosis di Indonesia. Jakarta: PDPI. p:26-40.
- [PTCG]. 2004. Pediatric Tuberculosis Collaborative Group. Targeted tuberculin skin testing and treatment of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics*. 114:1175-201.
- [TCIHR]. 2013. *Drug Bank* Version 4.3. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00951> (isoniazid) by The Canadian Institutes of Health Research.
- Amin Z., Bahar S., Tuberkulosis Paru. Dalam Sudoyo Aru, *et al. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid III*. Edisi V. Jakarta: Interna Publishing Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam; 2009. P 2230-7.
- Arimbi M.R. 2003. Tingkat Konsentrasi dalam Plasma Antara Isoniazid Generik dibandingkan Isoniazid Non-Generik. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma.
- Compagnon, P., Bouquet, S. and Houin, G. 2004. Suivi thérapeutique de l'isoniazide. In: Marquet, P. (ed), Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments. Paris: Elsevier.
- Comstock GW. 1999. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults?. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:847-50.
- Dipiro JT *et al.* 2005. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, Sixth Edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc., USA.
- Effendy. 2004. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Evans D. 1989. N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther* 42: 157–234.
- Fentimalia. 2010. Pemeriksaan Kadar Isoniazid dalam Plasma Darah Pasien TB Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. [Skripsi]. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Gandjar IG, Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Goodman, Gilman. 2007. *Dasar Farmakologi Terapi*. Volume 1, Edisi 10. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Gritter, R.J, Bobbit, J.M, dan Schwarting, A.e. 1985. Introduction of Chromatography. Penerjemah: K. Padmawinata. Pengantar Kromatografi. Edisi III. Bandung: Penerbit ITB. p:186
- Harmita. 2004. Review Artikel. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Jurnal Majalah Ilmu Kefarmasian. Departemen Farmasi: FMIPA UI, Vol 1, No. 3. [18 Juli 2017].
- Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Hasri FA, Darmawansyah, Indar. 2013. Studi Mutu Pelayanan Sentra Directly Observed Treatment Short-Course (DOTS) Di Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat Sulawesi Selatan. Makassar: Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Hasanuddin.
- Hendayana S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Herdwiani W. Dewi LVI, Peranginan JM. 2016. *Buku Ajar Farmakokinetik Klinik*. Jakarta: Penerbit TransInfo Media.
- Hiswani. 2004. Tuberkulosis merupakan Penyakit Infeksi yang Masih Menjadi Masalah Kesehatan Masyarakat. Medan: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatera Utara.
- Huber L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. London: Informa.
- Istiantoro YH, Setiabudy R. 2007. Tuberkulosis. *Farmakologi dan Terapi* .Edisi V. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. p:613-633.
- Jawetz, Melnick, Adfcerg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23. Jakarta: Erlangga. p:325.
- Johnson, E.L., dan Stevenson, R. 1991.. *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung: Penerbit ITB. p: 236.
- Karen Baxter. 2011. *Stockley's Drug Interactions 9th*. London: UK Pharmaceutical Press.



- Katzung BG. 2007. *Chapter 47:Antimicrobial Drugs. Basic and Clinical Pharmacology*. Edisi 9. USA: McGraw-Hill.
- Lestari, SW. 2014. Validasi Metode Penetapan Kadar Aliskiren dalam Plasma Darah secara *In Vitro* menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). [Skripsi]. Jakarta: UIN Syarif Hidayatulloh. [19 Januari 2017]
- Nugraheni B, Anggoro A.B,. 2016. Validasi Metode Analisis Ciprofloksasin menggunakan *High Performance Liquid Chromatography*. *Inovasi Teknik Kimia 1*: 6-8. [1 Agustus 2017]
- Mansyur S, Temasonge, Aditama TY, Jusuf A. 2001. The Pattern of Antituberculosis Drug in Pulmonary, Tuberculosis Pattern, TB Outpatient Clinic, *Jurnal Respiratory Indonesia*. 21:395-401.
- Martindale. 2007. *The Complete Drug Reference*. 35th Edition. The Pharmaceutical.
- Moussa A.L, El Bouazzi O, Serragui s, Tanani S.D, Soulaymani A. 2016. Rifampicin and Isoniazid Plasma Concentration in Relation to Adverse Reactions in Tuberculosis Patients: a Retrospective Analysis. *Therapeutic Advances in Drug Safety 7*: 239-247 [10 Agustus 2017]
- Mustschler E. 1991. *Dinamika Obat*. Mathilda B, Widiyanto, Anna S, penerjemah; . Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Nijland HM, Ruslami R, Stalenhoef JE. 2006. Exposure to rifampicin is strongly reduced in patients with tuberculosis and type 2 diabetes. *Clin Infect Dis* 43:848–54.
- Novizar D, Nawas A, Burhan E. 2010. Identifikasi Faktor Risiko Tuberkulosis Multidrug Resistant. *Majalah Kedokteran Indonesia*: 60 (12), 537-545.
- Palomina, Leao, Ritacco. 2007. Tuberculosis From Basic Science to Patient Care. <http://www.TuberculosisTextbook.com>. [20 Oktober 2016].
- Peloquin, C. 2002. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. *Drugs* 62: 2169–2183.
- Prihatni D, Parwati I, Sjahid I, Rita C. 2005. Efek Toksisitas Anti Tuberkulosis terhadap Kadar Aspartate Aminotransferase Serum Penderita Tuberkulosis Paru. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory* 12: 1-5. [12 Agustus 2017]

- Ritschel A, Wolfgang, Kearns L Gregory. 2009. *Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications*. American Pharmacist Association.
- Ritschel WA. 2004. *Handbook of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications Sixth Edition*. Americans Pharmachist Association (APHA).
- Sampurno OD. 2015. Tinjauan Farmakogenomik Rifampisin dalam Pengobatan Tuberkulosis Paru. *Biotek Medisiana Indonesia* 4.
- Sari, Ami. 2001. Pengalaman pelaksanaan DOTS di Puskesmas. Temu Ilmiah Respirologi. Surakarta.
- Shargel L, Andrew BC Yu, Susana Wu –Pong. 2012. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetic Sixth Edition*. New York: Mcgraw Hill Professionals.
- Shargel L, Andrew BC Yu. 1941. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Third Edition*. Appleton, Lange.
- Shargel L, Andrew BC Yu. 1999. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Fourth Edition.*, New York: Mcgraw Hill Professionals.
- Shargel, L. 1988. *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan*. Penerjemah : Fasich dan Sjamsiah. Edisi II. Surabaya: Airlangga University Press. Hal 32, 35, 355-356.
- Soetarno. 2009. *Farmakokinetika Dasar*. Surakarta: UNS Press.
- Stella. 2011. Optimasi dan Validasi Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid dalam Tablet 4 Fixed Dose Combination (4FDC) dan Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. [Skripsi]. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Departemen Farmasi. Universitas Indonesia.
- Sudoyo AW, Bambang S, Idrus A, Marcellus SK., Siti S. (eds). 2006. *Tuberkulosis Paru dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Penyakit Dalam. Universitas Indonesia. p:821-2.
- Sutarno. 2000. *Farmakokinetik*. Surakarta: UNS Press.
- Tjay TH, Kirana R. 2007. *Obat-Obat Penting Edisi ke-6*. Jakarta: Gramedia.

- Tjay TH, Rahardja L. 2007. *Obat-Obat Penting*. Jakarta: Gramedia.
- Vernon A.A. 2004. Rifampycin Antibiotics, with a Focus on Newer Agents, Dalam Rom, N.W., Garay, M.S. (penyunting). Philadelphia: Lippincot William & Wilkins. *Tuberculosis:2*
- Widodo E. 2004. Upaya Peningkatan Peran Masyarakat dan Tenaga Kesehatan Dalam Pemberantasan Tuberkulosis. Bogor: Bagian Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Widoyono. 2011. *Penyakit Tropis (Epidemiologi, Penularan, Pencegahan & Pemberantasannya)*. Surabaya: Penerbit Erlangga.
- World Health Organization. 2015. Global Tuberculosis Report. Switzerland.
- Yeti A, Candrawati E, Catur AWR. 2015. Pengetahuan Pasien Tuberculosis Berimplikasi Terhadap Kepatuhan Berobat . Malang: Program Studi Ilmu Keperawatan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Tribhuwana Tungadewi. *Jurnal Care* 3.
- Yustisia KD. 2015. Pengaruh Pemberian Tablet Curcuma Terhadap Kadar Rifampicin & Isoniazid Secara In-Vitro dengan KCKT [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

**L
A
M
P
I
R
A
N**

Lampiran 1 . Surat Uji Kelaikan Etik


HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Dr. Moewardi General Hospital
 RSUD Dr. Moewardi
School of Medicine Sebelas Maret University
 Fakultas Kedokteran Universitas sebelas Maret
 

ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 102 / II / HREC /2017

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas Maret University Of Surakarta
 Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta

after reviewing the proposal design, here with to certify
 setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan


That the research proposal with topic :
 Bahwa usulan penelitian dengan judul


**GAMBARAN KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH TERHADAP EFIKASI
 PENGOBATAN TUBERKULOSIS**

Principal investigator : Nadia Firdausi
 Peneliti Utama 19133963A


Location of research : Kabupaten B
 Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
Dinyatakan laik etik

Issued on : 11 Februari 2017
Chairman
Ketua

Dr. Hari Wijoso, dr. Sp.F,MM
 NIP. 19621022 199503 1 001



Lampiran 2. Surat Baku Isoniazid


PT INDO FARMA
INDOFARMA


SERTIFIKAT ANALISIS
No.: 032/QC/WS/V/16

Nama bahan : **ISONIAZID, Working Standard**
 No. kontrol : 16032F13
 Tanggal pelulusan : 18 Mei 2016
 Retest : Mei 2017
 Penyimpanan : Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya, suhu 25°C (suhu yang penyimpanan yang diperbolehkan 15 – 30°C)
 Reference standard : USP Isoniazide RS, Lot J0G205

Parameter Pengujian	Satuan	Hasil	Persyaratan
Pemerian	-	Sesuai	Serbuk hablur putih, tidak berbau.
Identifikasi	-	Positif	Positif -
Jarak lebur	°C	170.2 – 172.8	170 – 173
pH	-	7.13	6.0 – 7.5
Susut pengeringan	%	0.10	Maks. 1.0
Sisa pemijaran	%	0.03	Maks. 0.2
Logam berat	%	< 0.002	Maks. 0.002
Kadar (KCKT)	%	100.38	98.0 – 102.0 (sebagai zat kering)


Kesimpulan : Memenuhi Syarat sesuai USP 34

Bekasi, 18 Mei 2016


Fitra Hini, SSI, Apt.
 Plt Manajer Pengawasan Mutu

PT INDO FARMA, Tbk
 Commercial Office
 Jl. Tambak No. 2, Manggarai, Jakarta 13150
 Phone : (021) 85908350
 Fax : (021) 8574503
 Head Office/Factory
 Jl. Indofarma No. 1, Cikarang Barat, 17530, Jawa Barat, PO Box 4111/KT 10041, Indonesia
 Phone : (021) 88323971, 88323975
 Fax : (021) 88325972/73
 http : www.indofarma.co.id

Lampiran 2. Surat Baku Rifampisin




SERTIFIKAT ANALISIS
No. 066/QC/WS/VIII/16

Nama bahan : RIFAMPICIN, Working Standard
 No. Kontrol : I6066J07
 Tanggal pelulusan : 26 Agustus 2016
 Retest : Agustus 2017
 Penyimpanan : Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya
 Reference standard : Rifampicin USP Lot L01351

Parameter Pengujian	Satuan	Hasil	Persyaratan
Pemerian	-	Sesuai	Serbuk hablur, warna coklat merah
Identifikasi	-	Positif	Positif
Sifat hablur	-	Sesuai	Sesuai
pH	-	5.72	4.5 – 6.5
Susut pengeringan	%	0.66	Maks. 2.0
Senyawa sejenis	%		
• Rifampicin quinone		0.12	Maks. 1.5
• Senyawa sejenis lain		0.12	Maks. 1.0
• Senyawa sejenis total (kecuali Rifampicin quinone)		0.20	Maks. 3.5
Kadar (dihitung terhadap zat kering, KCKT)	%	99.87	95.0 – 103.0

Kesimpulan : memenuhi syarat sesuai USP 37

Bekasi, 26 Agustus 2016


Filtra Hini, S.Si, Apt.
 Plt. Manajer Pengawasan Mutu

PT INDOFARMA, Tbk.
 Commercial Office :
 Jl. Tambak No. 2, Manggarai, Jakarta 13150
 Phone : (021) 85908350
 Fax : (021) 8574503
 Head Office / Factory :
 Jl. Indofarma No. 1, Cikarang Barat, 17530 Jawa Barat, PO BOX : 4111/JKT 10041, INDONESIA
 Phone : (021) 88323971, 88323975
 Fax : (021) 88323972/73
 http : www.indofarma.co.id

Lampiran 4. Bahan dan Alat**Serbuk INH****Serbuk Kalium Dihidrogen Fosfat****Asetonitril****Aquabidest****Metanol****Fase Gerak Terpilih (KH_2PO_4 - Asetonitril 99:1)**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Syringe KCKT



Syringe Penyaring



Sonicator Elmasonic



Penyaring Selulose 0,45µm



Penyaring Selulose 0,2µm



Mikropipet 200 μ g**Vortex****Sentrifugator****Vakutainer****Alat-alat gelas****Timbangan Analitik**

Pipet



Spektrofotomer UV-Vis

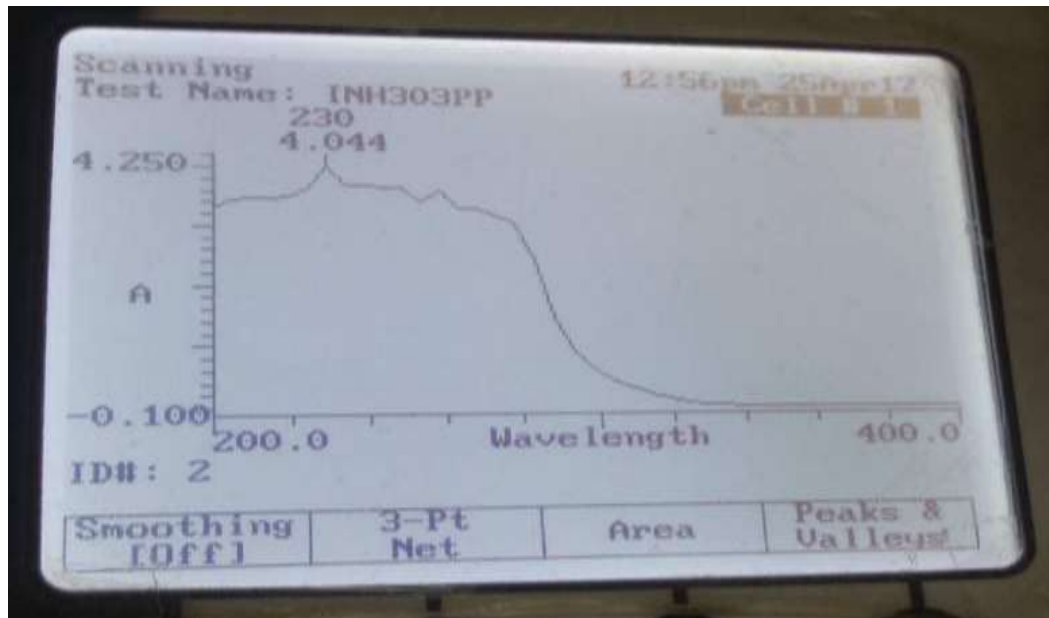


Plasma Darah

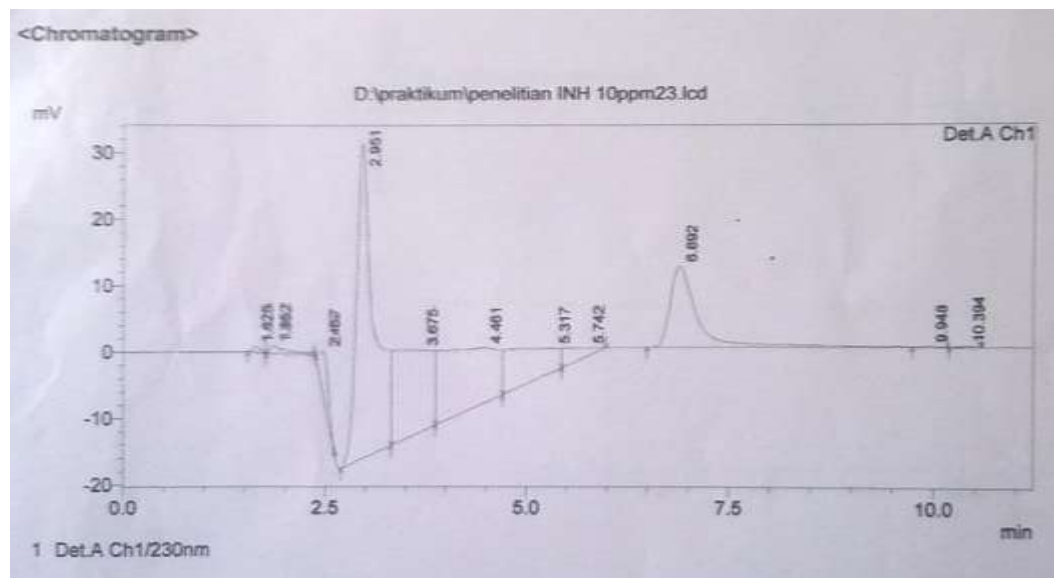


Lampiran 5. Gambar

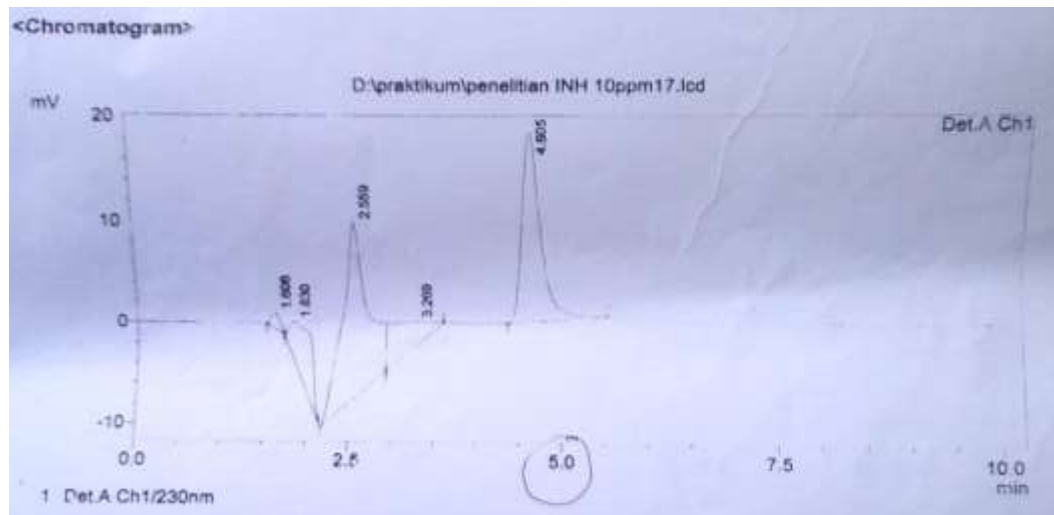
5.1. Pembacaan panjang gelombang INH



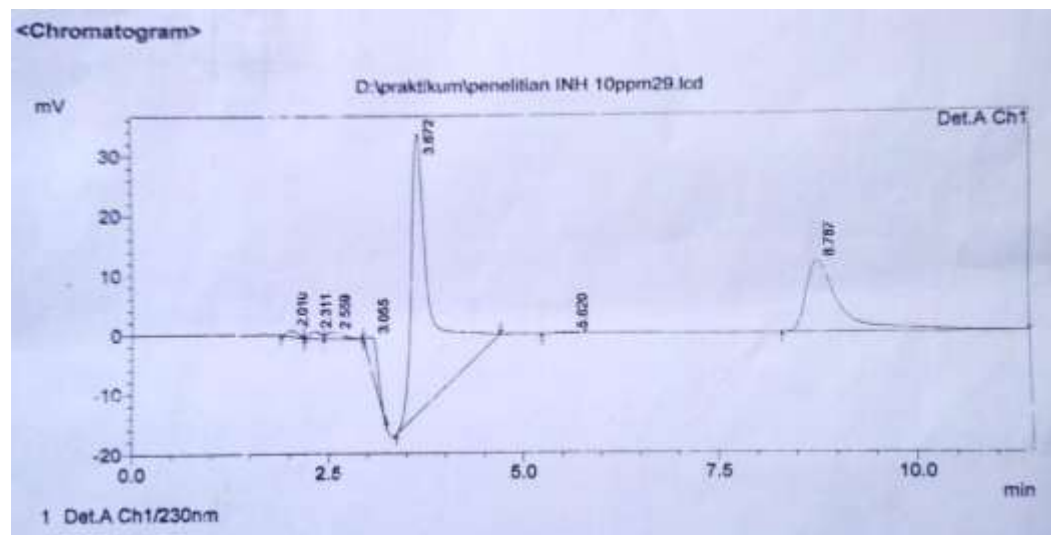
5.2. Kromatogram Fase Gerak KH₂PO₄ 10 mmol pH 6,2-asetonitril 99:1, laju alir 1 ml/menit)



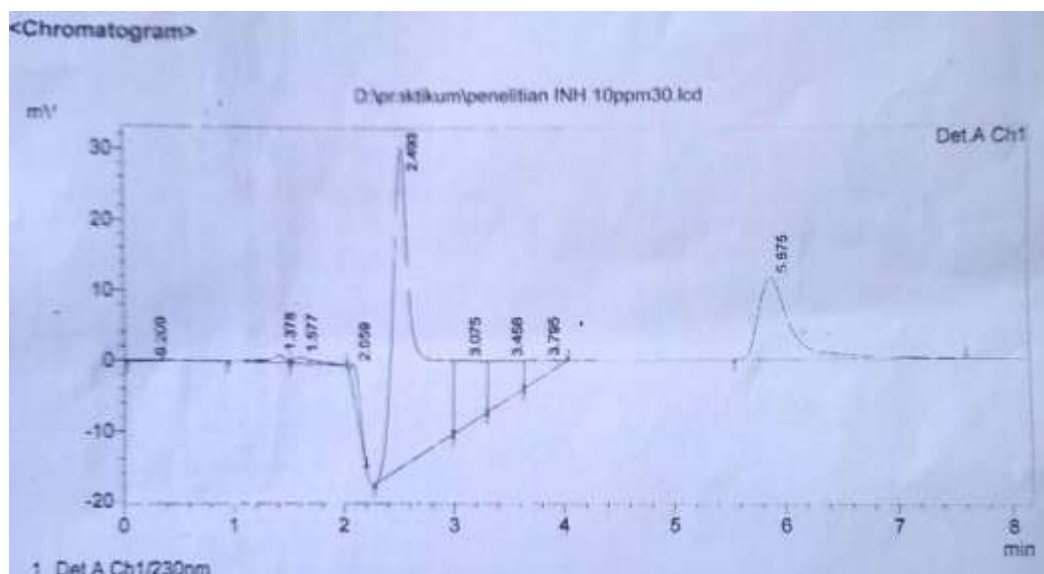
5.3. Kromatogram Fase Gerak KH₂PO₄ 10 mmol pH 6,2-asetonitril 97:3, laju alir 1 ml/menit)



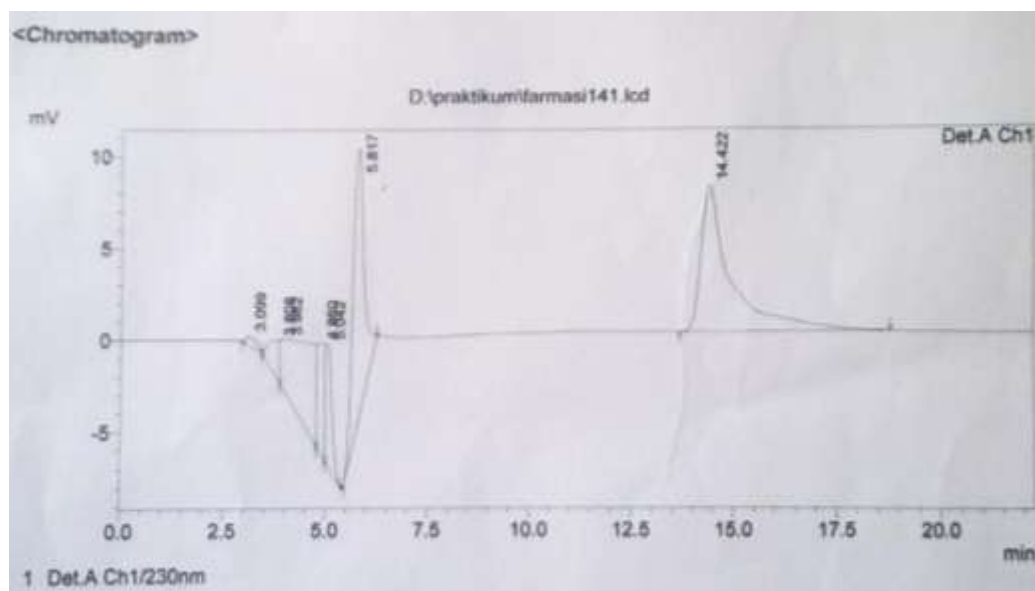
5.4. Kromatogram Fase Gerak KH₂PO₄ 10 mmol pH 6,2-asetonitril 99:1, laju alir 0,8 ml/menit)



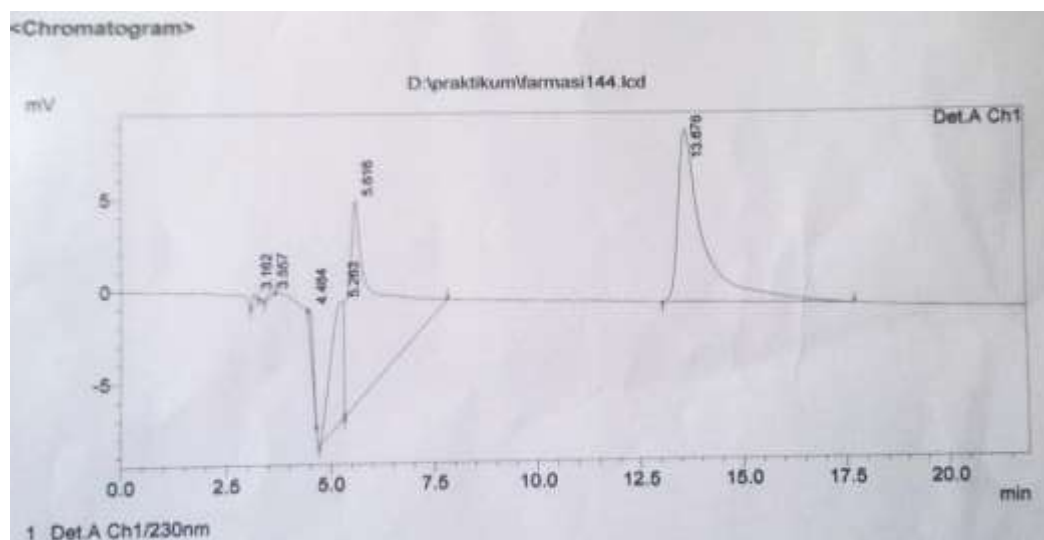
5.5. Kromatogram Fase Gerak KH_2PO_4 10 mmol pH 6,2-asetonitril 99:1, laju alir 1,2 ml/menit)



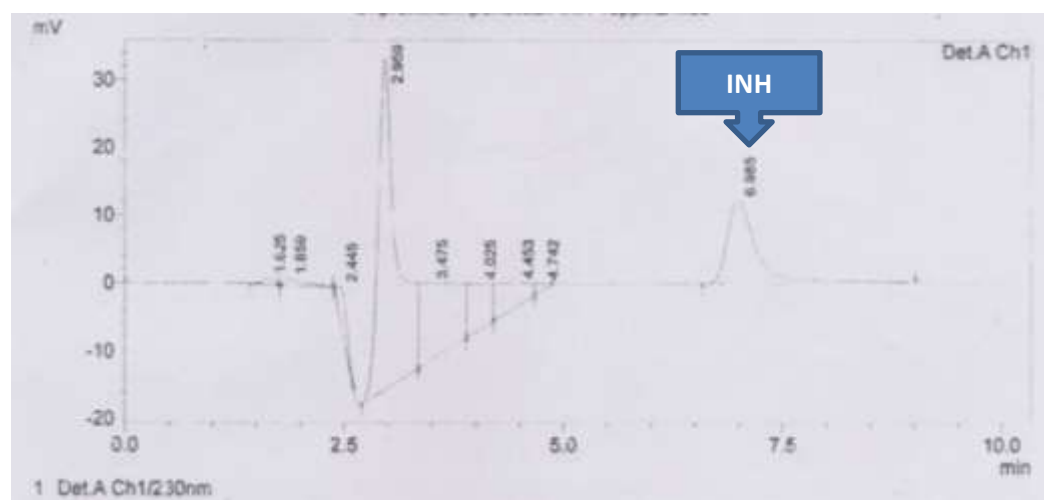
5.6. Kromatogram Fase Gerak KH_2PO_4 5 mmol pH 6,2-asetonitril 99:1, laju alir 1 ml/menit)



5.7. Kromatogram Fase Gerak KH₂PO₄ 15 mmol pH 6,2-asetonitril 99:1, laju alir 1 ml/menit)



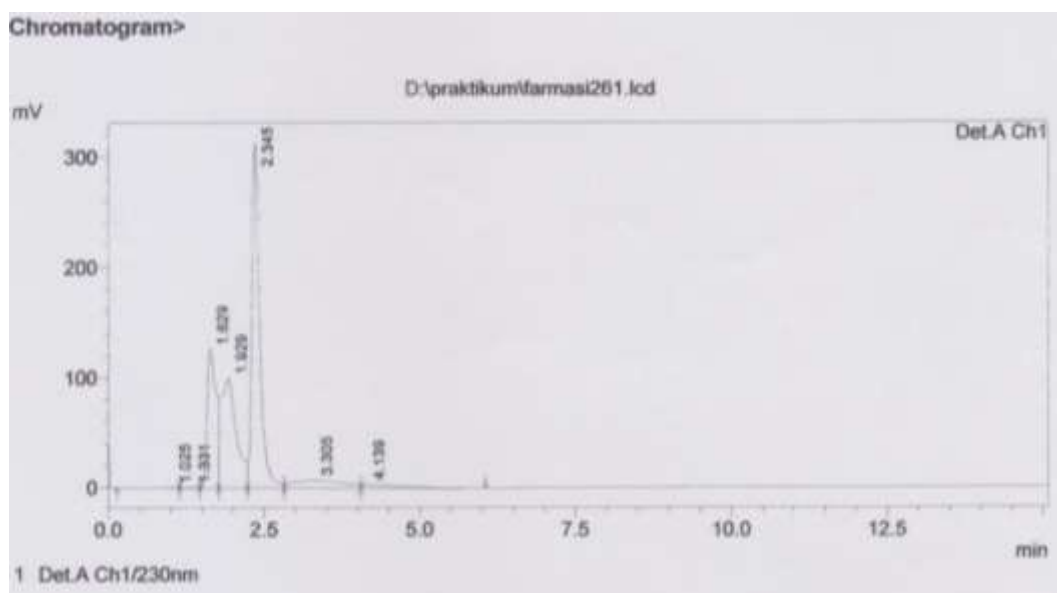
5.8. Kromatogram Larutan INH Baku pada Fase Gerak Terpilih



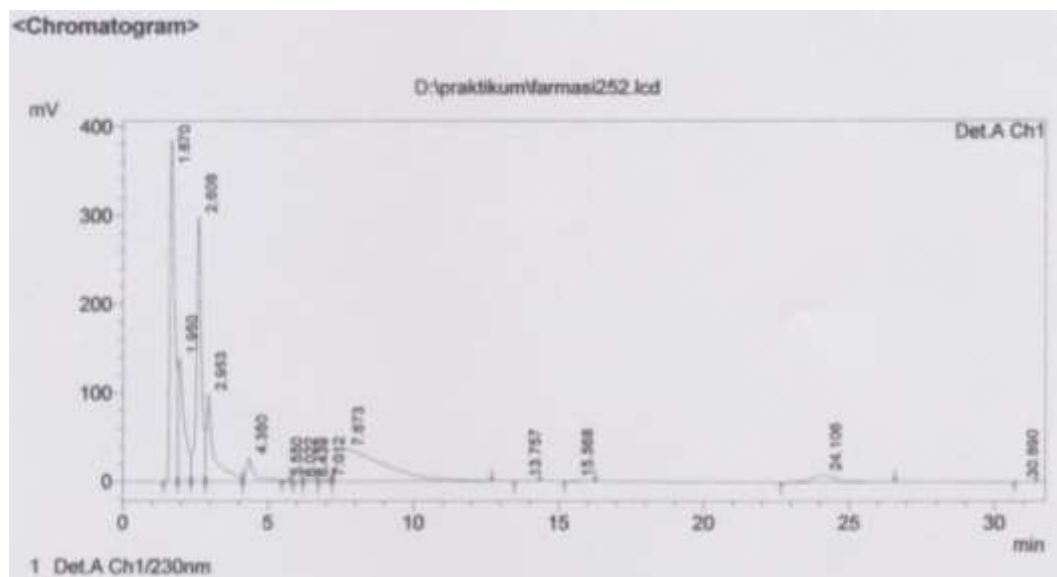
PeakTable							
Detector A Ch1 230nm							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	1.625	7722	934	0.467	1.037	0.889	6375.610
2	1.859	16234	1006	0.982	1.118	3.433	3938.294
3	2.445	37577	4181	2.273	4.645	1.769	16330.493
4	2.959	730717	48691	44.208	54.102	0.000	10106.957
5	3.475	338248	11435	20.464	12.706	0.000	0.000
6	4.025	124138	6887	7.510	7.652	0.000	0.000
7	4.453	101988	3536	6.170	3.929	0.000	0.000
8	4.742	10796	1112	0.653	1.236	0.000	0.000
9	6.985	285484	12217	17.272	13.574	1.952	18036.938
Total		1652905	89999	100.000	100.000		

5.9. Kromatogram Plasma Plasebo (Perbandingan Deproteinasi Asetonitril dan TCA)

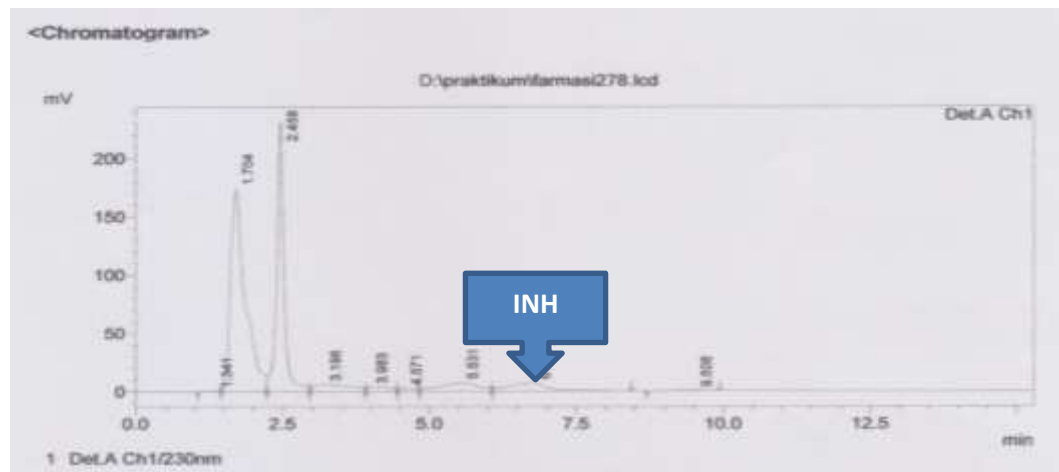
a. Deproteinasi dengan Asetonitril



b. Deproteinasi dengan TCA



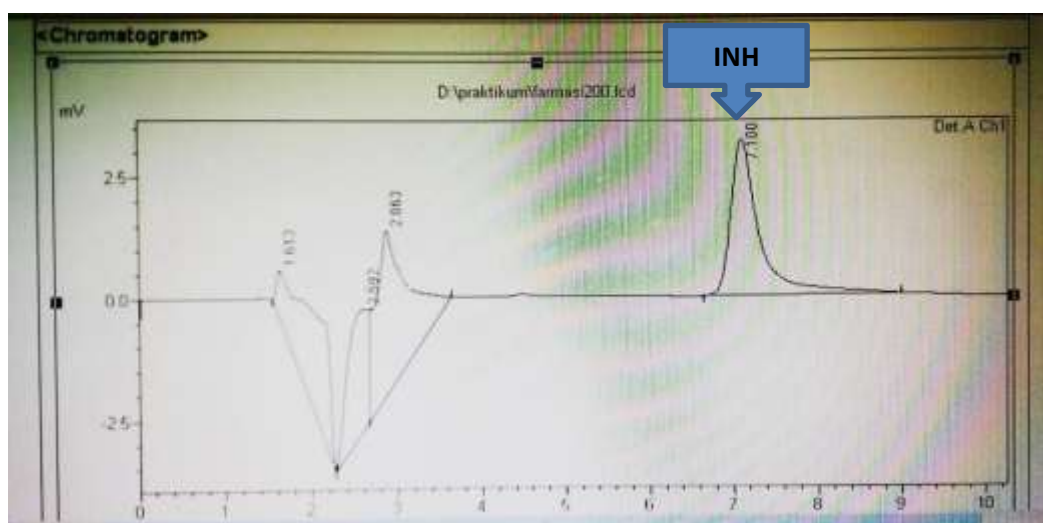
5.10. Kromatogram Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/ Spesifitas (Plasma + INH)



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	1.341	5196	656	0.084	0.151	0.000	4273.029
2	1.704	3028978	174424	49.716	40.268	0.000	2166.118
3	2.458	2004063	230930	32.255	53.313	0.000	15191.455
4	3.196	278547	6117	4.483	1.412	0.000	133.640
5	3.983	108571	3784	1.747	0.874	0.000	77.098
6	4.571	50195	2404	0.808	0.555	0.000	131.131
7	5.531	338363	7358	5.446	1.699	0.000	2049.823
8	6.755	330708	7260	5.323	1.676	0.000	3290.290
9	9.508	8651	222	0.139	0.051	0.774	9485.451
Total		6213273	433156	100.000	100.000		

5.11. Kromatogram Kurva kalibrasi 1; 2; 3; 4; 5; 6; dan 7 µg/ml

a. Konsentrasi 1 µg/ml

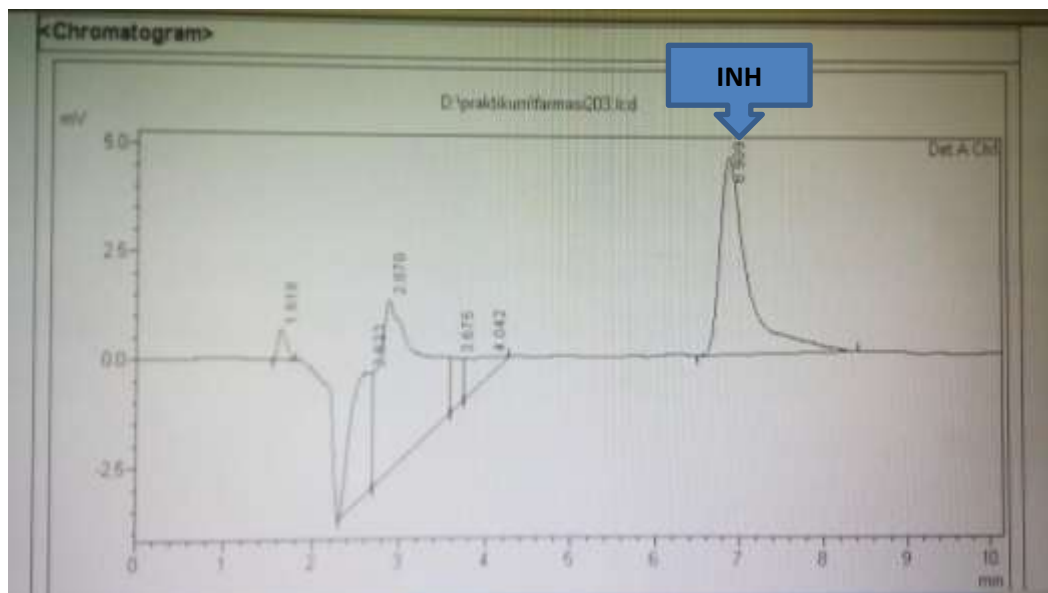


Detector A Ch1 230nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	1.613	63658	976	22.839	9.580	5.016	556.221
2	2.592	46483	2521	16.677	24.758	0.000	494.893
3	2.863	91983	3428	33.001	33.668	0.000	1448.645
4	7.100	76603	3258	27.483	31.994	2.111	19752.949
Total		278727	10183	100.000	100.000		

Konsentrasi	Replikasi	W.R	Area	N	HETP	Tf
1	1	7.100	77417	19859,792	0,000755	2,014
	2	7.100	76603	19752,949	0,000759	2,111
	3	7,009	74327	19996,438	0,00075	2.090

b.Konsentrasi 2 µg/ml



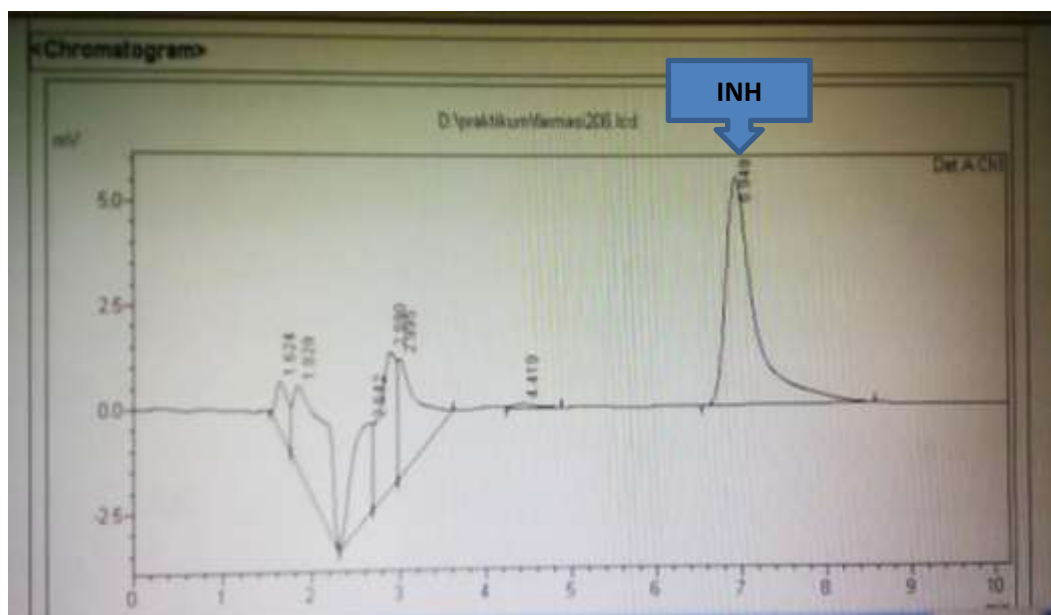
PeakTable

Detector A Ch1 230nm

Peak#	Ret Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	1.618	4540	679	1.419	4.969	1.514	7406.136
2	2.633	48551	2750	15.171	20.123	0.000	239.842
3	2.870	132004	3985	41.247	29.158	0.000	1255.739
4	3.675	11314	1116	3.535	8.165	0.000	0.000
5	4.042	15617	454	4.880	3.323	0.000	0.000
6	6.909	108005	4683	33.748	34.262	2.566	20412.935
Total		320031	13667	100.000	100.000		

Konsentrasi	Replikasi	W.R	Area	N	HETP	Tf
2	1	6,941	106134	20289,683	0,000739	2,276
	2	6,909	108005	20412,935	0,000735	2,566
	3	6,893	111165	20138,462	0,000745	2,802

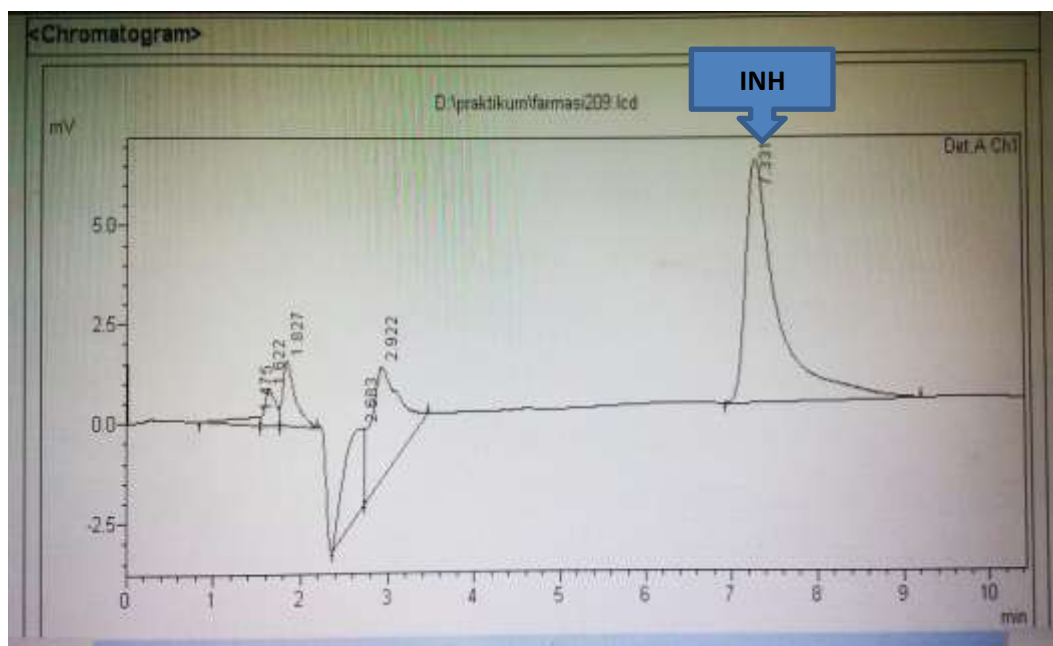
c. Konsentrasi 3 µg/ml



PeakTable							
Detector A Ch1 230nm							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%	Tailing Factor	N
1	1.624	11648	1129	3.478	6.583	0.000	393.492
2	1.829	59803	1932	17.856	11.268	0.000	952.832
3	2.642	38032	2196	11.356	12.809	0.000	541.975
4	2.890	45675	3298	13.638	19.238	0.000	1257.908
5	2.995	45398	2858	13.555	16.673	0.000	0.000
6	4.419	1972	110	0.589	0.643	0.000	9980.803
7	6.949	132390	5621	39.529	32.785	2.429	19382.684
Total		334917	17144	100.000	100.000		

Konsentrasi	Replikasi	W.R	Area	N	HETP	Tf
3	1	6,918	133667	19585,342	0,000766	2,385
	2	6,949	132390	19382,684	0,000774	2,429
	3	6,929	150656	20106,315	0,000746	3,124

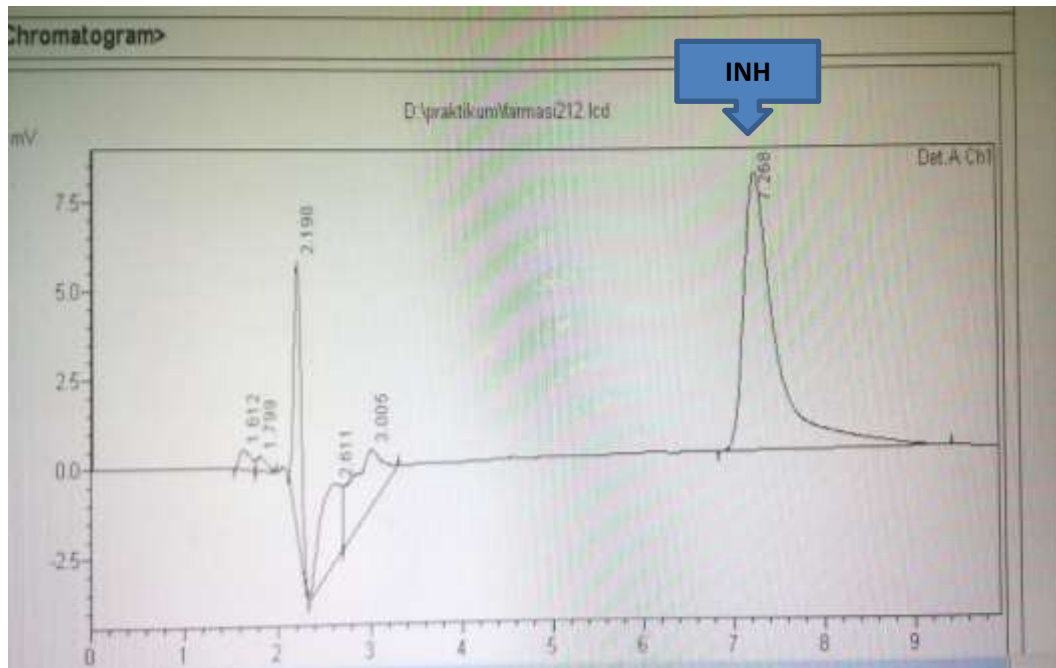
d. Konsentrasi 4 µg/ml



PeakTable							
Detector A Ch1 230nm							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	1.475	4658	195	1.614	1.409	0.000	0.000
2	1.622	7722	868	2.676	6.270	0.000	3037.466
3	1.827	15912	1642	5.514	11.862	0.000	5657.114
4	2.683	36122	2059	12.517	14.877	0.000	870.100
5	2.922	64254	2864	22.265	20.694	0.000	1967.662
6	7.331	159920	6213	55.414	44.887	2.792	20254.912
Total		288589	13841	100.000	100.000		

Konsentrasi	Replikasi	W.R	Area	N	HETP	Tf
4	1	6,888	172701	20117,178	0,000746	2,759
	2	7,331	159920	20254,912	0,000741	2,792
	3	7,298	169308	20312,598	0,000738	2,979

e.Konsentrasi 5 µg/ml



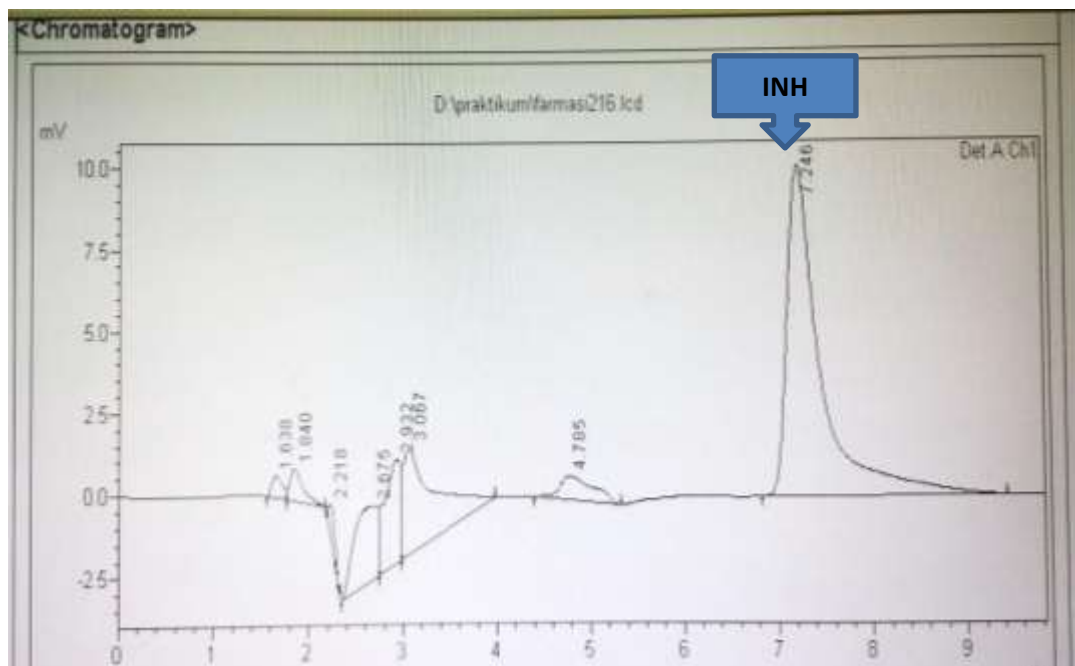
PeakTable

Detector A Ch1 230nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	1.612	4710	556	1.444	2.740	0.000	2949.810
2	1.799	3050	400	0.935	1.972	0.000	4104.083
3	2.198	39481	7527	12.104	37.109	1.143	21005.300
4	2.611	38508	2216	11.806	10.923	0.000	1549.818
5	3.005	41319	1597	12.667	7.871	0.000	2287.093
6	7.268	199118	7989	61.044	39.385	2.573	19654.486
Total		326186	20285	100.000	100.000		

Konsentrasi	Replikasi	W.R	Area	N	HETP	Tf
5	1	7,312	203006	20903,903	0,000718	2,728
	2	7,268	199118	19654,486	0,000763	2,573
	3	7,296	206770	20732,681	0,000723	2,726

f. Konsentrasi 6 µg/ml



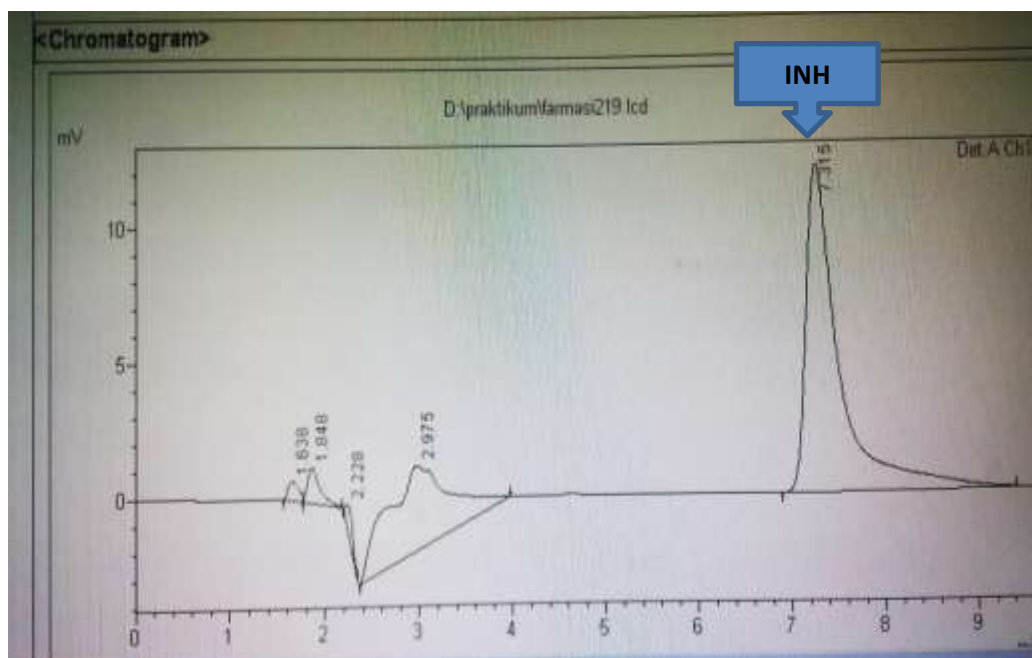
PeakTable

Detector A Ch1 230nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height %	Tailing Factor	N
1	1.638	5345	657	1.208	2.984	0.000	3734.834
2	1.840	9423	977	2.130	4.434	0.000	5643.751
3	2.218	4731	843	1.069	3.828	1.647	28437.490
4	2.675	41002	2245	9.268	10.190	0.000	350.296
5	2.932	39702	3147	8.975	14.283	0.000	974.581
6	3.067	74219	3268	16.777	14.834	0.000	1488.119
7	4.785	18747	729	4.238	3.311	1.312	5870.487
8	7.246	249214	10163	56.334	46.135	2.641	20631.184
Total		442383	22029	100.000	100.000		

Konsentrasi	Replikasi	W.R	Area	N	HETP	Tf
6	1	7,292	255627	20394,895	0,000735	2,699
	2	7.250	245479	20528,534	0,000731	2,556
	3	7,246	249214	20631,184	0,000727	2,641

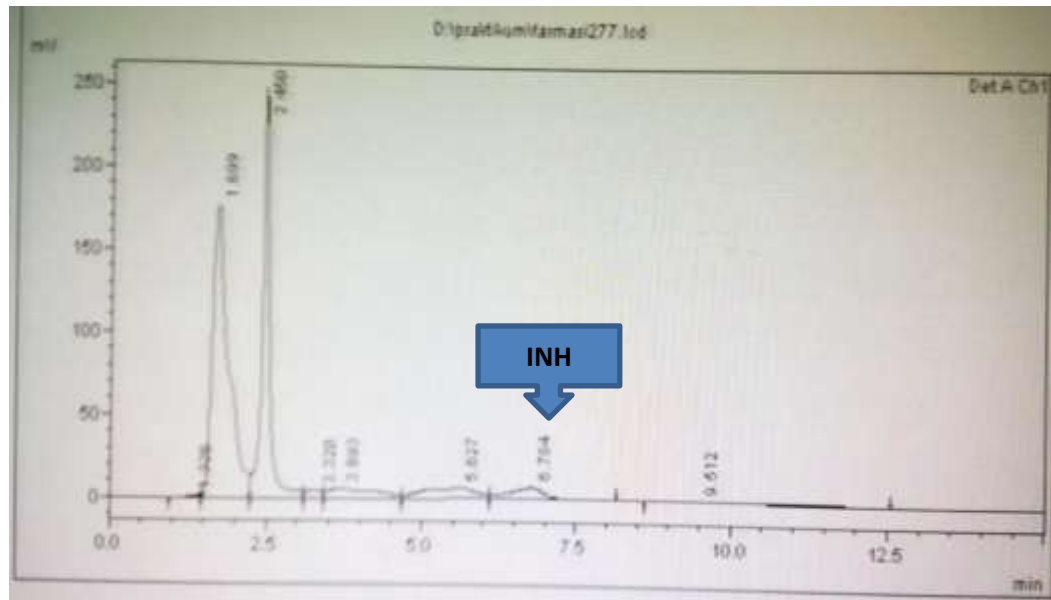
g. Konsentrasi 7 µg/ml



PeakTable							
Detector A Chl 230nm							
Peak#	Ret Time	Area	Height	Area%	Height%	Tailing Factor	N
1	1.638	5395	701	1.158	3.845	0.000	4824.275
2	1.848	11784	1305	2.529	7.162	0.000	6761.629
3	2.228	4824	871	1.035	4.779	1.632	27922.360
4	2.975	146445	3136	31.428	17.208	1.285	858.392
5	7.315	297527	12210	63.850	67.005	2.579	20855.791
Total		465975	18222	100.000	100.000		

Konsentrasi	Replikasi	W.R	Area	N	HETP	Tf
7	1	7,281	301689	20976,429	0,000715	2,747
	2	7,315	297527	20855,791	0,000719	2,579
	3	7,267	306447	20721,005	0,000724	2,723

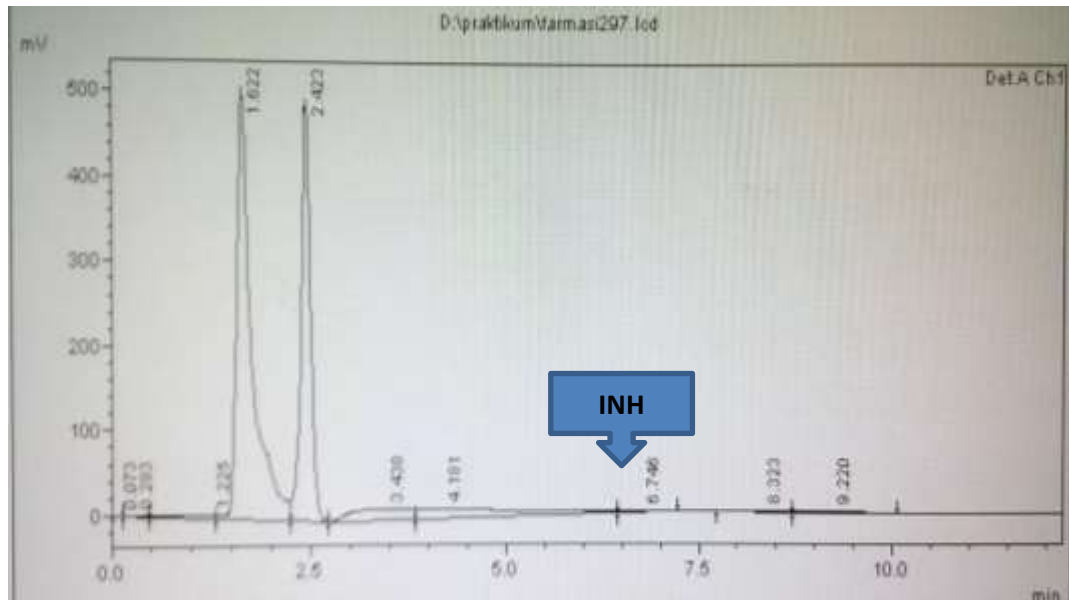
5.12. Kromatogram Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Plasebo (*In Vitro*)



PeakTable							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	1.336	6078	687	0.096	0.152	0.000	3540.208
2	1.699	3147539	177538	49.853	39.390	0.000	2225.203
3	2.450	2004259	248462	31.745	55.126	0.000	17665.467
4	3.320	82525	4587	1.307	1.018	0.000	26.958
5	3.693	305484	5105	4.838	1.133	0.000	170.065
6	5.627	399052	6541	6.320	1.451	0.000	1376.491
7	6.784	305172	7209	4.834	1.599	0.000	3381.704
8	9.512	63903	589	1.006	0.131	2.088	1004.457
Total		6313613	450719	100.000	100.000		

5.13. Kromatogram Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Pasien TBC

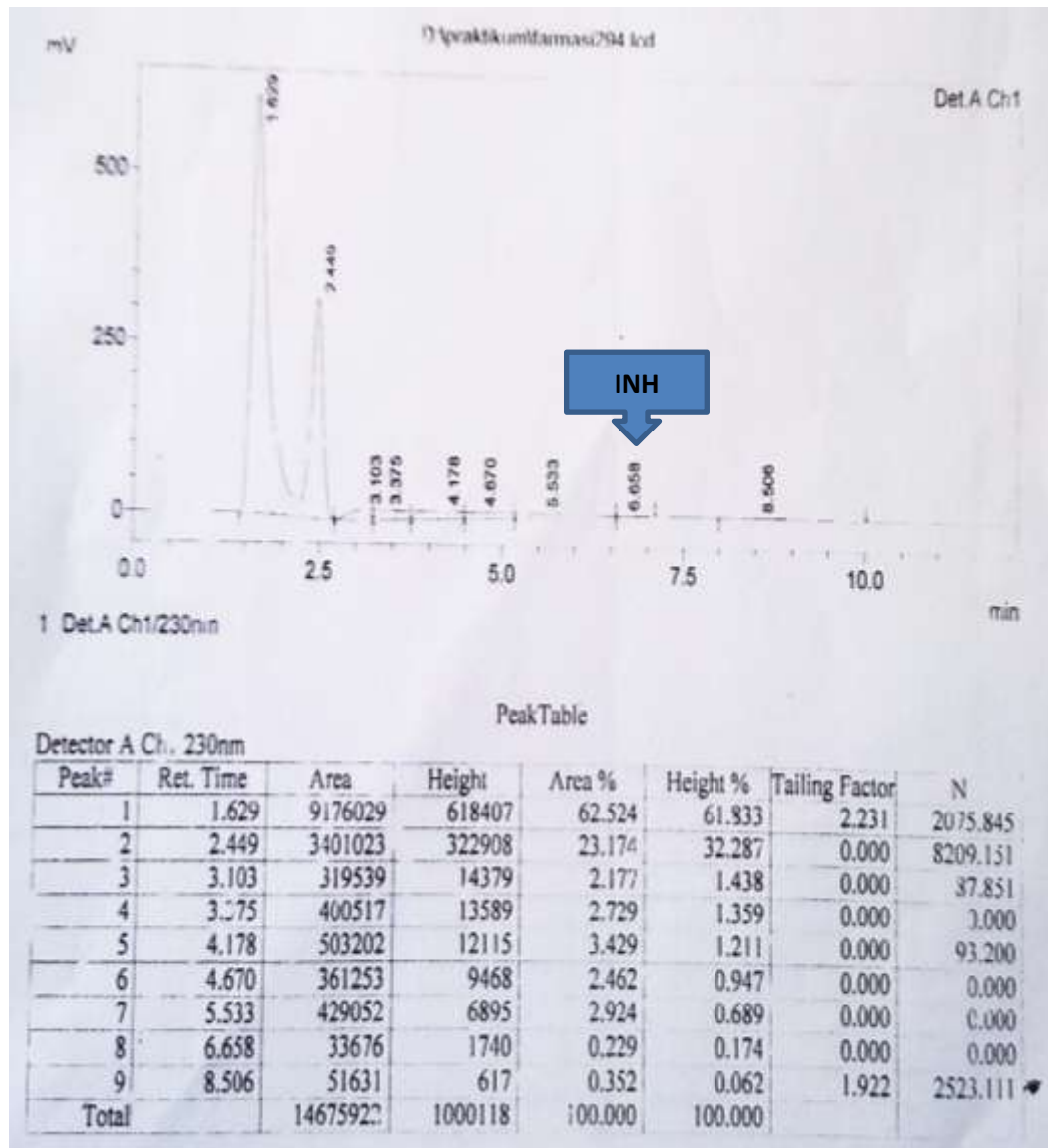
a. Sampel 1



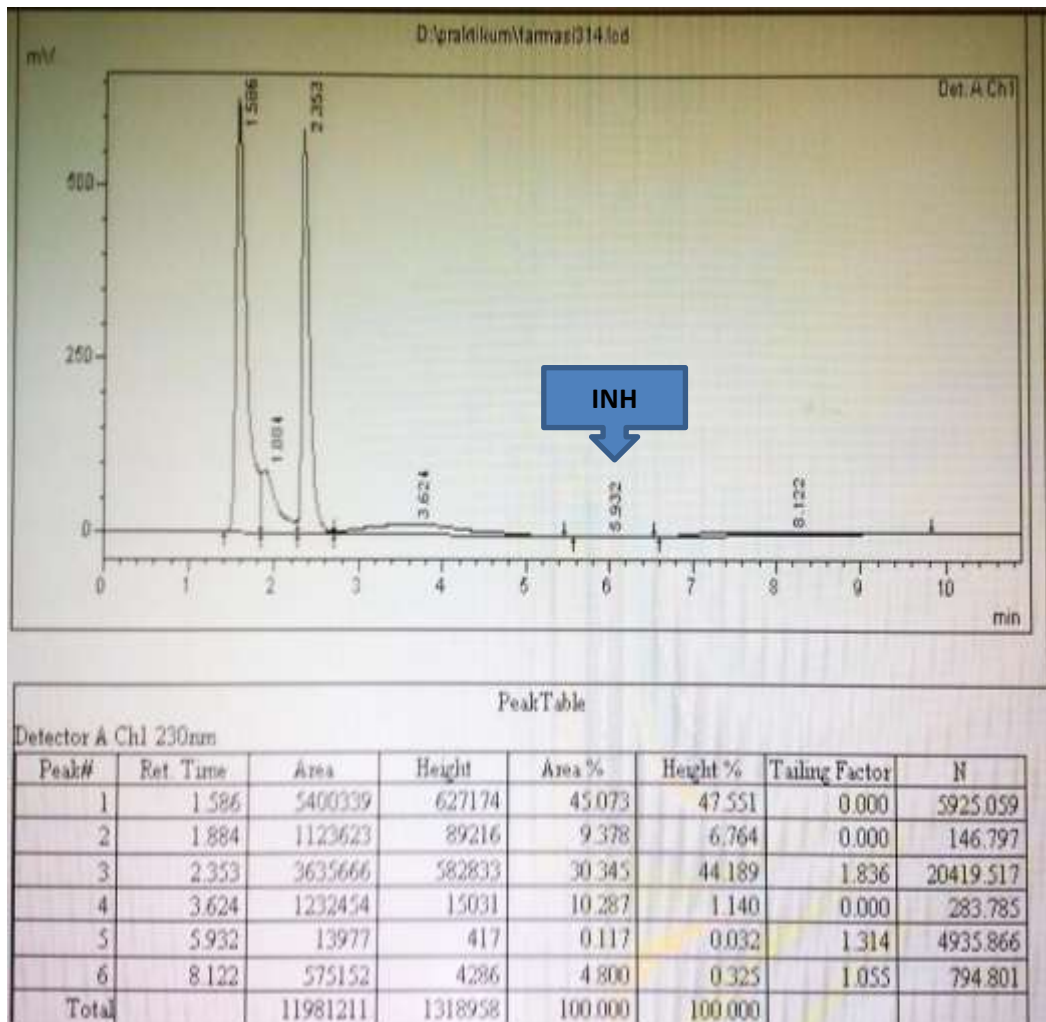
Peak Table							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Tailing Factor	N
1	0.073	2327	334	0.018	0.032	0.000	0.000
2	0.283	23850	1134	0.184	0.108	0.000	0.000
3	1.225	174631	4844	1.350	0.463	0.000	0.000
4	1.622	6743725	511633	52.125	48.897	2.467	3553.784
5	2.423	4104741	500888	31.727	47.870	0.989	13547.347
6	3.438	708938	13401	5.430	1.281	0.000	115.124
7	4.181	1106115	12179	8.530	1.164	0.000	55.317
8	6.746	50622	1411	0.391	0.135	0.000	0.000
9	8.323	8116	214	0.063	0.020	0.000	5419.538
10	9.220	14658	302	0.113	0.029	0.000	4774.097
Total		12937722	1046341	100.000	100.000		

Detector A Ch1 270nm

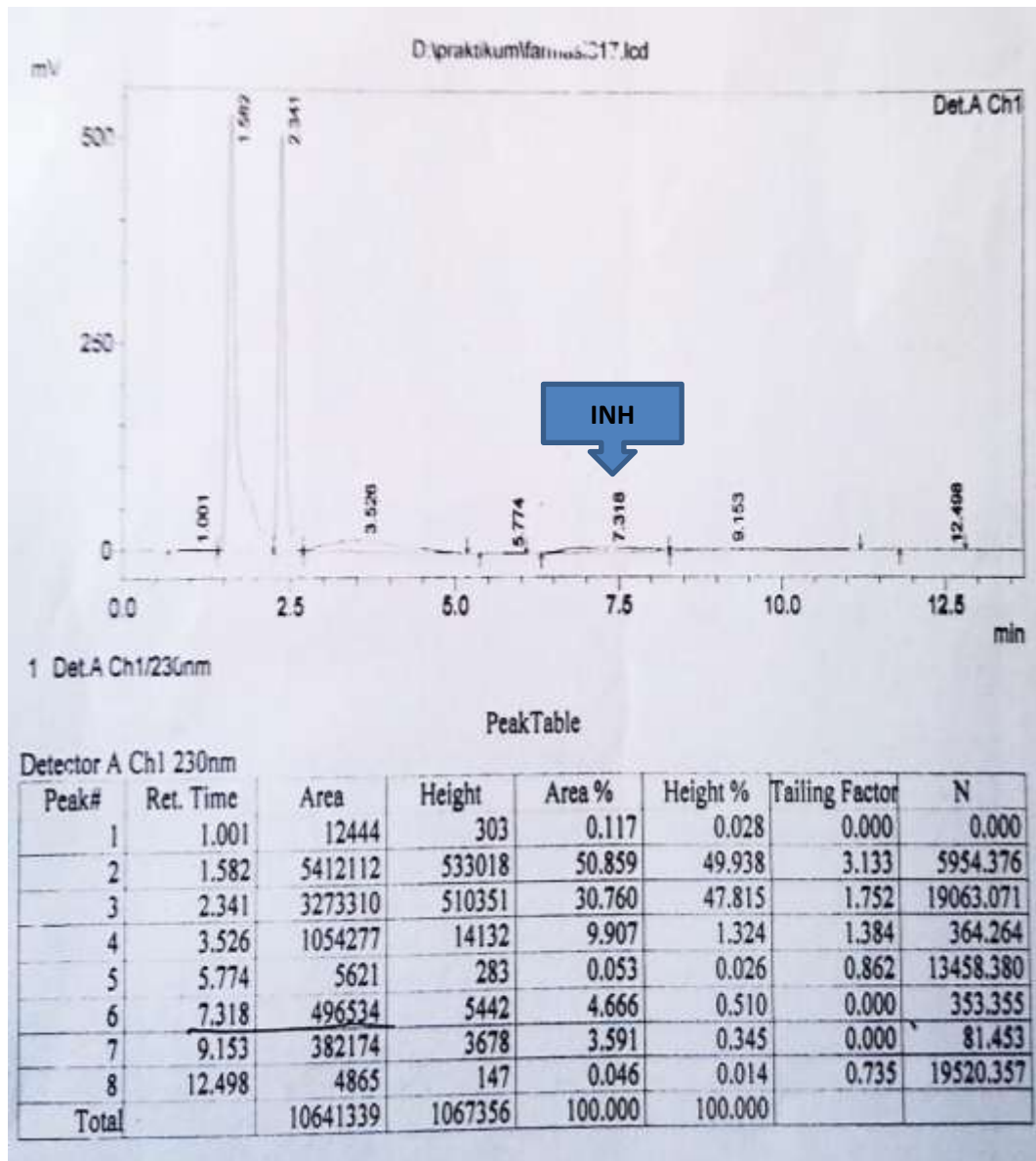
b. Sampel 3



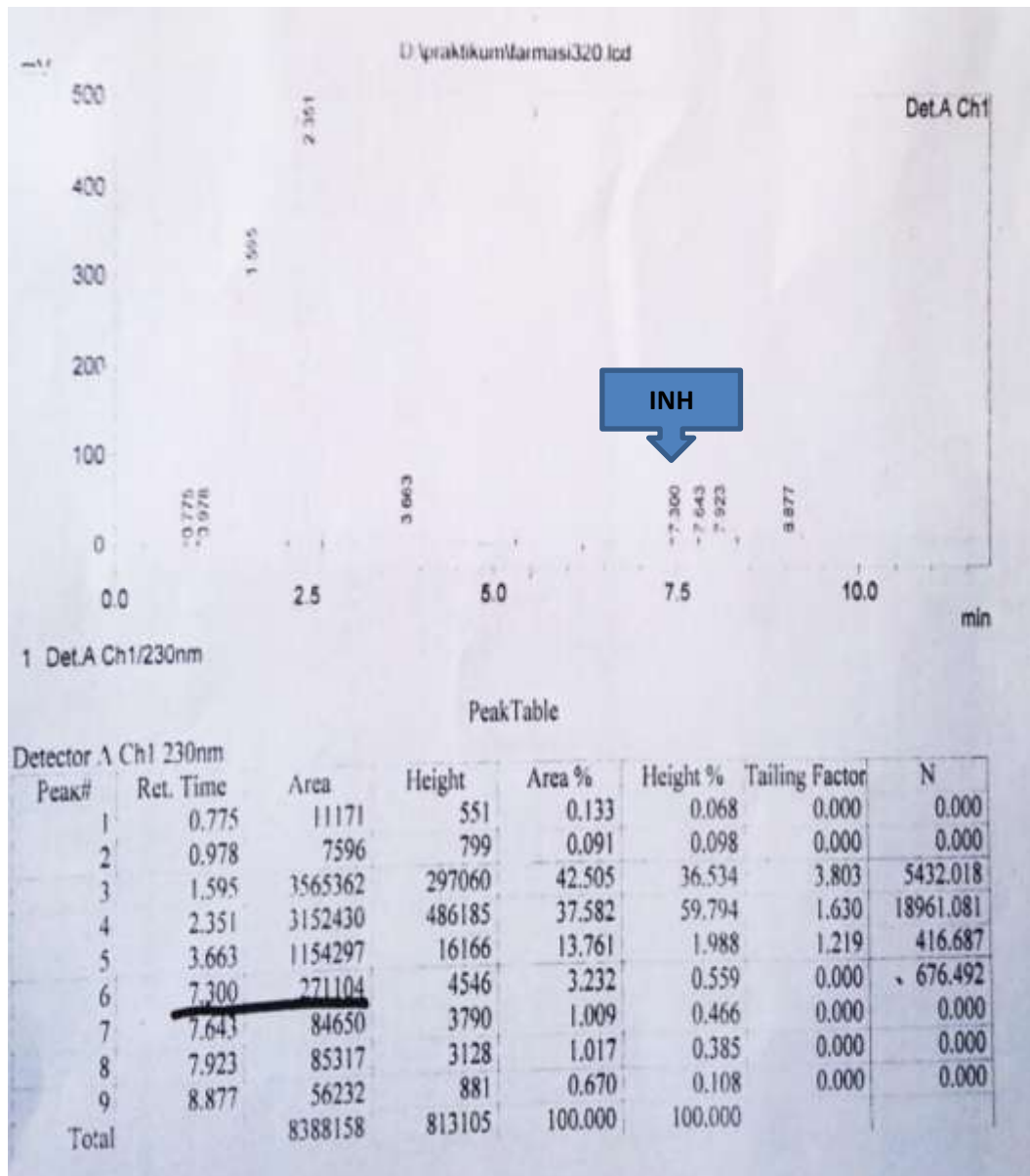
c. Sampel 8



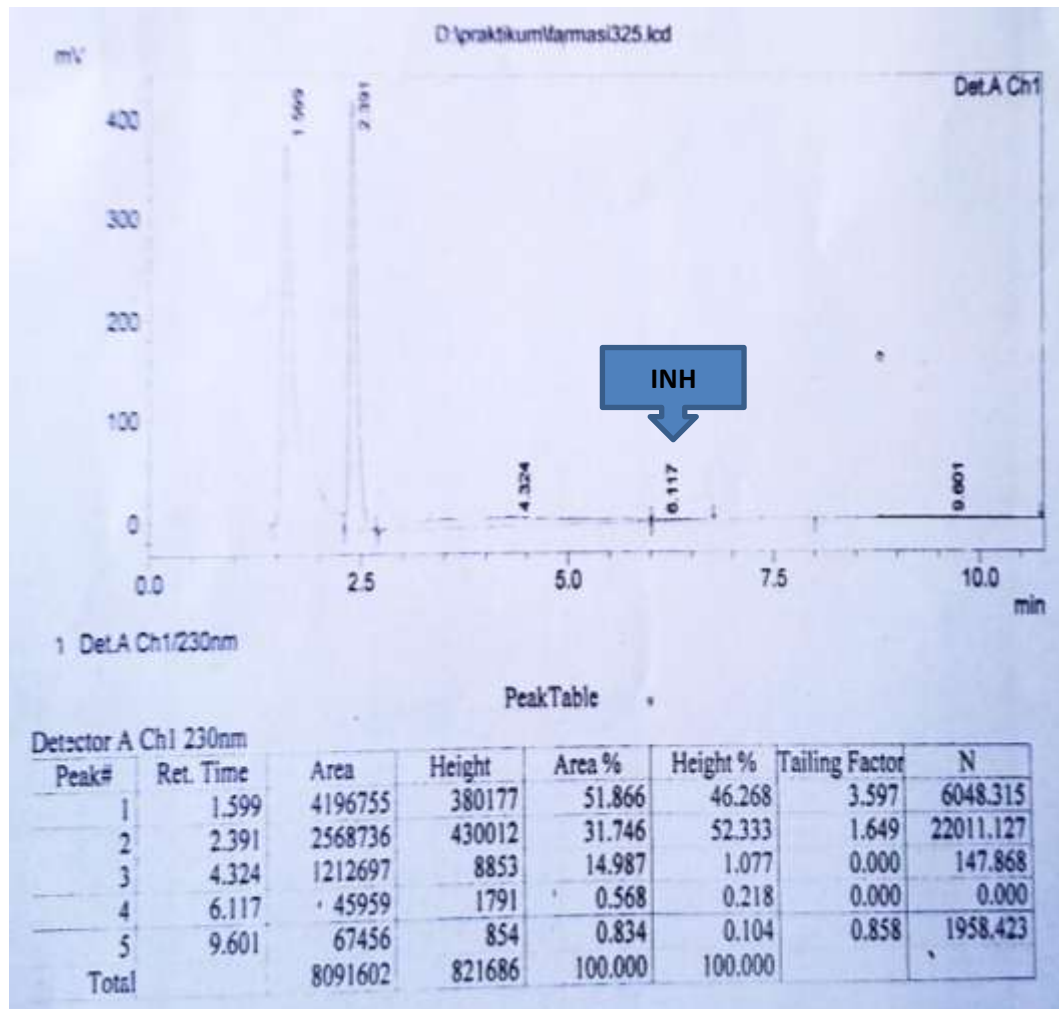
d. Sampel 9



e. Sampel 10

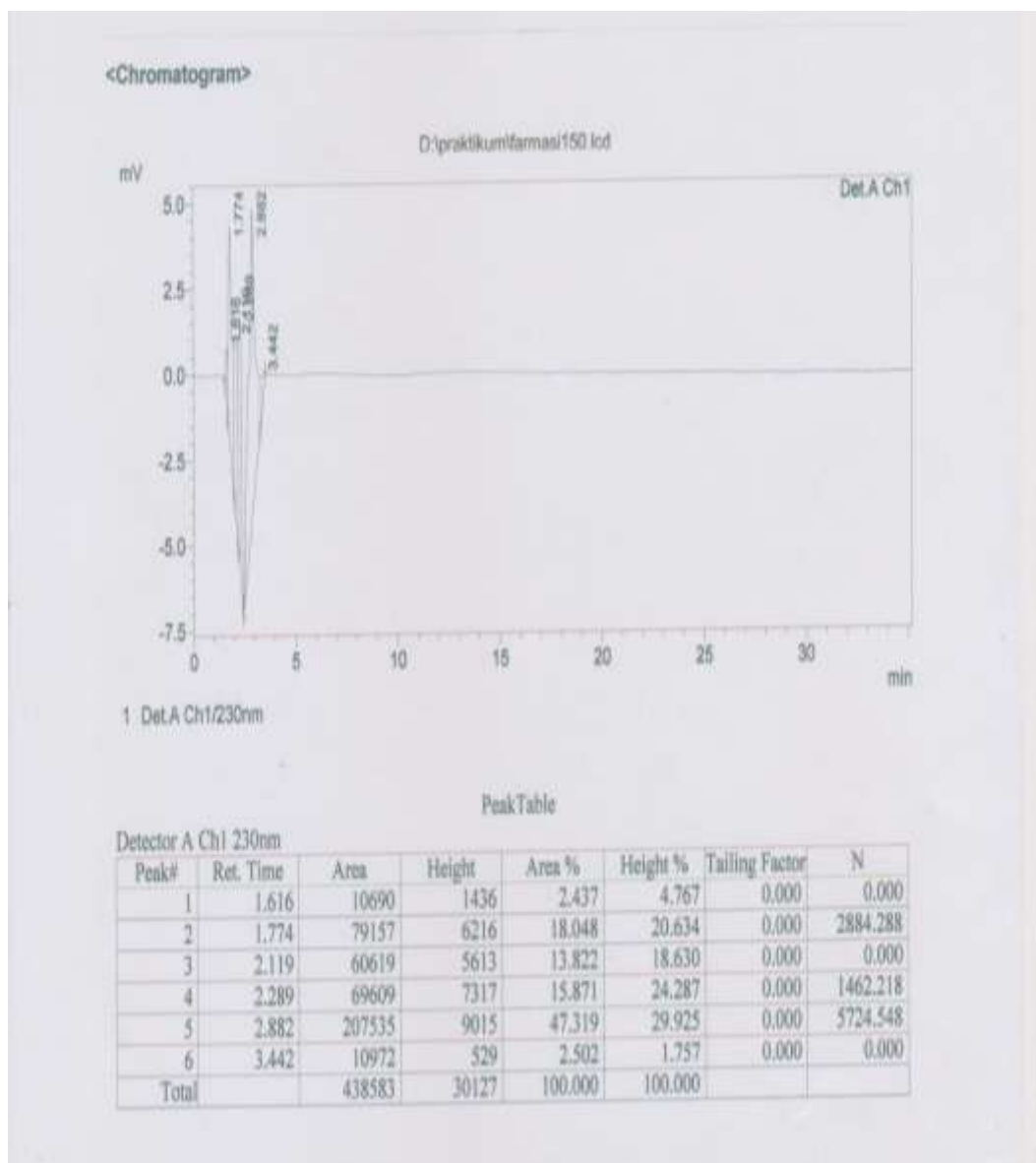


f. Sampel 11

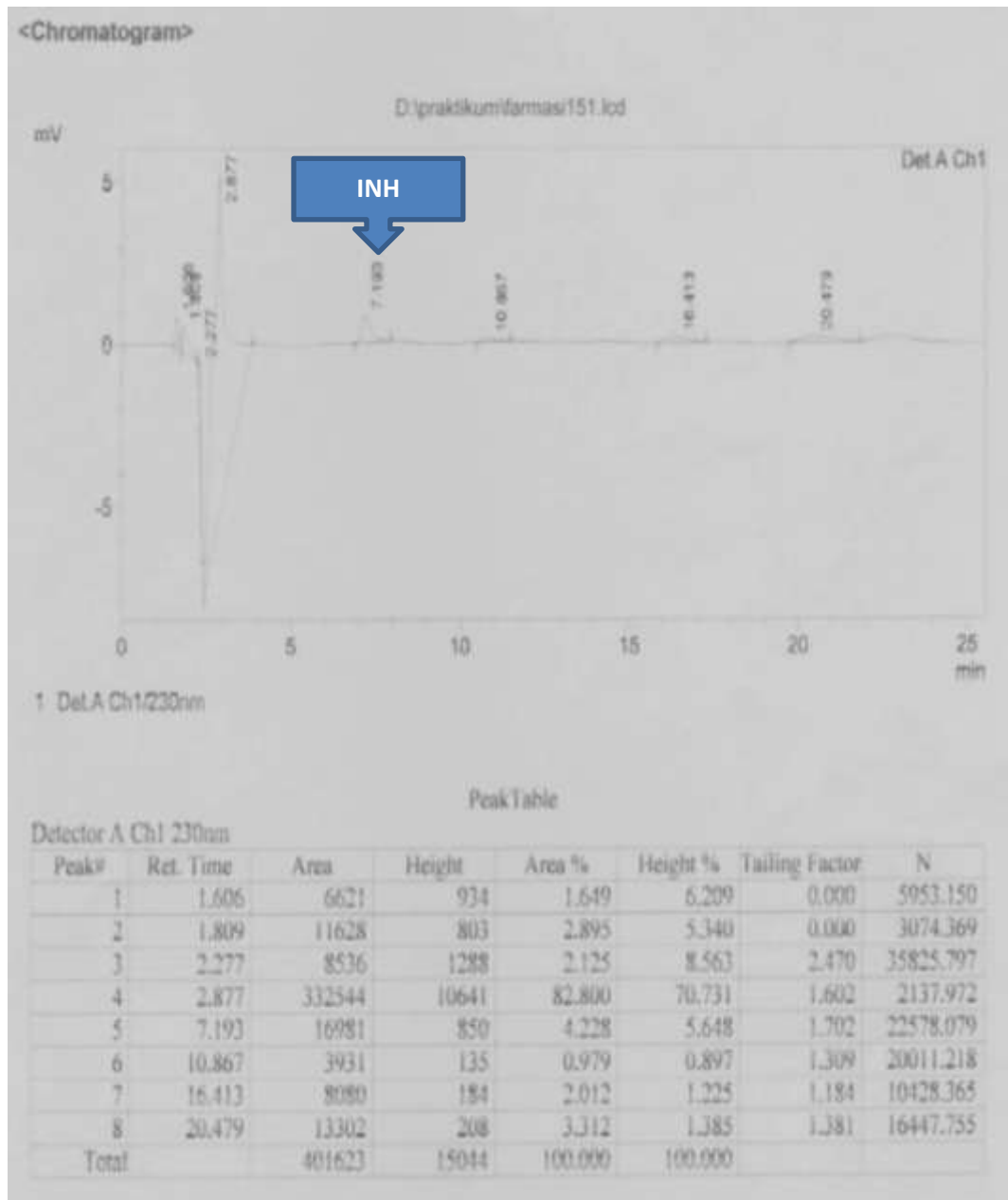


5.14. Kromatogram Rifampisin

a. Larutan Baku Rifampisin



b. Campuran Larutan Baku INH dan Rifampisin



Lampiran 6. Tabel dan Perhitungan

6.1. Perhitungan Pembuatan Larutan

a. Larutan Baku INH 303 $\mu\text{g/ml}$ (Untuk pengukuran λ optimum)

$$303 \mu\text{g/ml} = 0,303 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{0,303 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{x}{25 \text{ ml}}$$

$$x = \frac{7,58 \text{ mg/ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$x = 7,58 \text{ mg}$$

*Jadi, untuk membuat larutan baku INH 303 $\mu\text{g/ml}$ dalam 25 ml aquabidest ditimbang serbuk INH sebesar 7,58 mg.

Pengenceran 10 $\mu\text{g/ml}$ dari 303 $\mu\text{g/ml}$:

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$x \cdot 303 \mu\text{g/ml} = 10 \text{ ml} \cdot 10 \mu\text{g/ml}$$

$$x = 0,33 \text{ ml}$$

*Jadi, untuk membuat pengenceran 10 $\mu\text{g/ml}$ diambil 0,33 ml dari larutan baku 303 $\mu\text{g/ml}$ lalu di-add-kan 10 ml aquabidest.

b. Larutan Baku INH 100 $\mu\text{g/ml}$ (Untuk kurva kalibrasi)

$$100 \mu\text{g/ml} = 0,100 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{0,100 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{X}{50 \text{ ml}}$$

$$x = \frac{5 \text{ mg/ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$x = 5 \text{ mg}$$

*Jadi, untuk membuat larutan baku INH 100 µg/ml dalam 50 ml aquabidest ditimbang serbuk INH sebesar 5 mg.

Pengenceran Kurva Kalibrasi

Menggunakan rumus $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$

➤ **Konsentrasi 1 µg/ml**

$$X \cdot 100 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \cdot 1 \mu\text{g/ml}$$

$$X = 0,05 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat pengenceran 1 µg/ml diambil sebanyak 0,05 ml dari larutan baku 100 µg/ml lalu di-add-kan 5 ml aquabidest.

➤ **Konsentrasi 2 µg/ml**

$$X \cdot 100 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \cdot 2 \mu\text{g/ml}$$

$$X = 0,1 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat pengenceran 2 µg/ml diambil sebanyak 0,1 ml dari larutan baku 100 µg/ml lalu di-add-kan 5 ml aquabidest.

➤ **Konsentrasi 3 µg/ml**

$$X \cdot 100 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \cdot 3 \mu\text{g/ml}$$

$$X = 0,15 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat pengenceran 3 µg/ml diambil sebanyak 0,15 ml dari larutan baku 100 µg/ml lalu di-add-kan 5 ml aquabidest.

➤ **Konsentrasi 4 µg/ml**

$$X \cdot 100 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \cdot 4 \mu\text{g/ml}$$

$$X = 0,2 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat pengenceran 4 µg/ml diambil sebanyak 0,2 ml dari larutan baku 100 µg/ml lalu di-add-kan 5 ml aquabidest.

➤ **Konsentrasi 5 µg/ml**

$$X \cdot 100 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \cdot 5 \mu\text{g/ml}$$

$$X = 0,25 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat pengenceran 5 µg/ml diambil sebanyak 0,25 ml dari larutan baku 100 µg/ml lalu di-add-kan 5 ml aquabidest.

➤ **Konsentrasi 6 µg/ml**

$$X \cdot 100 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \cdot 6 \mu\text{g/ml}$$

$$X = 0,3 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat pengenceran 6 µg/ml diambil sebanyak 0,3 ml dari larutan baku 100 µg/ml lalu di-add-kan 5 ml aquabidest.

➤ **Konsentrasi 7 µg/ml**

$$X \cdot 100 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \cdot 7 \mu\text{g/ml}$$

$$X = 0,35 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat pengenceran 7 µg/ml diambil sebanyak 0,35 ml dari larutan baku 100 µg/ml lalu di-add-kan 5 ml aquabidest.

c. Larutan baku INH 300 µg/ml (Untuk uji *In Vitro*)

$$300 \mu\text{g/ml} = 0,3 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{0,300 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{X}{25 \text{ ml}}$$

$$x = \frac{7,5 \text{ mg/ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$x = 7,5 \text{ mg}$$

*Jadi, untuk membuat larutan baku INH 300 µg/ml dalam 25 ml aquabidest ditimbang serbuk INH sebesar 7,5 mg.

Pengenceran 50 µg/ml dari 300 µg/ml:

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$x \cdot 300 \mu\text{g/ml} = 10 \text{ ml} \cdot 50 \mu\text{g/ml}$$

$$x = 1,67 \text{ ml}$$

*Jadi, untuk membuat pengenceran 50 µg/ml diambil 1,67 ml dari larutan baku 300 µg/ml lalu di-add-kan 10 ml aquabidest.

d. Fase gerak Kalium Dihidrogen Fosfat 15 mmol : asetonitril 99:1

$$15 \text{ mmol} = 0,015 \text{ mol}$$

$$\text{Massa} = \text{Mol} \times \text{MR}$$

$$= 0,015 \text{ mol} \times 136,09$$

$$= 2,041 \text{ gram}$$

- Fase gerak perbandingan KH_2PO_4 : Asetonitril 99:1 dalam 500 ml. Berarti, 495 ml larutan KH_2PO_4 dan 5 ml Asetonitril
- Jumlah KH_2PO_4 yang dilarutkan dalam 495 aquabidest :

$$\frac{2,041 \text{ gram}}{x} = \frac{990 \text{ ml}}{495 \text{ ml}}$$

$$= \frac{1010,295}{990}$$

$$= 1,0205 \text{ gram} \approx 1020,5 \text{ mg}$$

e. Larutan baku Rifampisin 10 µg/ml

$$10 \mu\text{g/ml} = 0,01 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{0,01 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} = \frac{X}{50 \text{ ml}}$$

$$x = \frac{0,5 \text{ mg/ml}}{1 \text{ ml}}$$

$$x = 0,5 \text{ mg}$$

*Jadi, untuk membuat larutan baku Rifampisin 10 µg/ml dalam 50 ml aquabidest ditimbang serbuk Rifampisin sebesar 0,5 mg

6.2. Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas

Konsentrasi (µg/ml)(x)	Luas area puncak (mV/s)(y)	Luas area berdasar regresi linear (mV/s)(y')	(y-y')	(y-y') ²
2	108434,6667	104063,1334	4371,533	19110303,1
3	138904,3333	138803,5667	100,7666	10153,90768
4	167309,667	173544,0001	-6234,33	38866908,79
5	202964,6667	208284,4334	-5319,77	28299918,1
6	250106,6667	243024,8667	7081,8	50151890,3
			Σ(y-y')kuadrat	136439174,2

A	34582,267	b	34740,433	r²	0,988
----------	-----------	----------	-----------	----------------------	-------

6.3. Perhitungan LOD dan LOQ

$$S_b = \sqrt{\frac{(y-y')^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{136439174,2}{3}} = 6743,866$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{\text{slope}} = \frac{3 \times 6743,866}{34740,433} = 0,582 \text{ µg/ml}$$

$$\text{LOD} = \frac{10 \times S_b}{\text{slope}} = \frac{10 \times 6743,866}{36597,167} = 1,94 \text{ µg/ml}$$

6.4. Uji Akurasi dan Perolehan Kembali

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/ml}$) (x)	Luas Area (mV/s) (y)	Konsentrasi berdasar regresi linear ($\mu\text{g/ml}$)(y')	Rata-rata y'	% diff	%recovery
1	79374	1,306170559	1,233250504	30,6170559	130,6171
	78634	1,285950409		28,5950409	128,595
	72108	1,107630546		10,7630546	110,7631
rata-rata	76705,33333			23,3250504	123,3251
4	168551	3,742889892	3,482505367	-6,4277527	93,57225
	162560	3,579188651		-10,520284	89,47972
	145954	3,125437558		-21,864061	78,13594
rata-rata	159021,6667			-12,937366	87,06263
7	309699	7,599692211	7,542338029	8,56703159	108,567
	308766	7,574198427		8,20283468	108,2028
	304335	7,453123449		6,47319213	106,4732
rata-rata	307600			7,74768613	107,7477

6.5. Uji Presisi

a. Intra Hari

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/ml}$)(x)	Hari	Luas Area (mV/s) (y)	rata-rata area	$\Sigma(x-\bar{x})^2$	SD intra hari	RSD intra hari(%)
1	1	79374	76705,33333	31977010,7	3998,563	5,212888
		78634				
		72108				
	2	77417	76115,66667	5130290,67	1601,607	2,104175
		76603				
		74327				
4	1	168551	159021,6667	274091909	11706,663	7,361678
		162560				
		145954				
	2	172701	167309,7	87666984,7	6620,687	3,957145
		159920				
		169308				
7	1	309699	307600	16425582	2865,797	0,931664
		308766				
		304335				
	2	301689	301887,6667	39842402,7	4463,317	1,478469
		297527				
		306447				

b. Antar Hari

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/ml}$)(x)	Luas Area (mV/s) (y)	rata-rata area	$\Sigma(x-\bar{x})^2$	SD Intra hari	RSD intra hari(%)
1	79374	76410,5	6271476,917	1119,953	1,46570563
	78634				
	72108				
	77417				
	76603				
	74327				
4	168551	163165,6667	77465884,89	3936,137	2,41235615
	162560				
	145954				
	172701				
	159920				
	169308				
7	309699	304743,8333	17535685,47	1872,735	0,61452761
	308766				
	304335				
	301689				
	297527				
	306447				

6.6. Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Darah Plasebo (*In Vitro*)

Replikasi	Waktu Retensi (menit)	Area (mV/S)	N	HETP	Tf	Kadar INH dalam plasma plasebo ($\mu\text{g/ml}$)
1	6,788	148387	6341,494	0,002365373	0,911	3,275858196
2	6,792	158397	2851,474	0,005260437	0,939	3,563995074
3	6,784	305172	3381,704	0,004435634	0	7,788899197
4	6,755	330708	3290.290	0,004558869	0	8,523950477
5	6,759	356326	2411,659	0,006219785	0	9,26136212
Rerata	6,7756	259798	3746,58275	0,00456802	0,37	6,482813013

6.7. Pengukuran Kadar INH dalam Plasma Pasien TBC (*In Vivo*)

Sampel	File Name	Replikasi	Waktu Retensi (menit)	Area (mV/S)	N	HETP	Tf	Kadar INH dalam plasma plasebo ($\mu\text{g/ml}$)
1	283	1	0	0	0	0	0	0
	297	2	6,746	50622	0	0	0	0,462
3	294	1	8,506	51631	2523,111	0,005945042	1,922	0,492
	295	2	0	0	0	0	0	0
8	314	1	8,122	575152	794,801	0,018872649	1,055	15,560
	315	2	8,011	484017	318,071	0,047159282	0	12,937
9	317	1	7,318	496534	353,355	0,042450227	0	13,297
	318	2	7,691	576970	745,103	0,020131445	1,229	15,613
10	320	1	7,3	271104	676,492	0,022173211	0	6,808
	321	2	7,203	308199	0	0	0	7,876
11	325	1	6,117	45959	0	0	0	0,327
	327	2	6,108	45856	0	0	0	0,325
RATA-RATA			7,3645	250691,4	541,0933	0,015673	0,228 4	6,221

6.8. Outcome Klinis Pasien TBC

Sampel	Usia	Awal Pengobatan			Bulan ke-2 (pasca tahap intensif)		Bulan ke-4 (pasca tahap lanjutan)					Kadar INH dalam darah pasien TBC (µg/ml)
		BB	BTA	FT	BTA	FT	BB	BTA	FT	Gejala Klinis		
										Demam Intermitten	Batuk	
1	45	40	+	+	-	+	45	-	-	-	-	0,462
3	27	46	+	+	-	+	49	-	-	-	+	0,491
5	50	50	-	+	+	+	55	-	-	-	-	14,249
9	37	46	+	+	-	+	47	-	-	-	-	14,455
10	44	40	+	+	-	+	45	+	+	-	+	7,342
11	44	39	+	+	-	+	40	-	-	-	-	0,326

Keterangan: (+) Positif, (-) Negatif, (BB) Berat Badan, (BTA) Bakteri Tahan Asam, (FT) Foto toraks.

6.9. Analisis Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		kadar INH
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	6.14133
	Std. Deviation	6.650435
Most Extreme Differences	Absolute	.302
	Positive	.302
	Negative	-.180
Kolmogorov-Smirnov Z		1.047
Asymp. Sig. (2-tailed)		.223

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
kadar INH	12	6.14133	6.650435	1.919815

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	5% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
kadar INH	3.199	11	.008	6.141333	6.01817	6.26449

Lampiran 7. Rumus-Rumus

1. Perhitungan *Height Equivalent to A Theoretical Plate* (HETP) :

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

(Jhonson & Stevenson, 1991)

2. Perhitungan Limit deteksi dan limit kuantitasi

Simpangan baku residual :

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum(y-y')^2}{n-2}}$$

(Harmita, 2004)

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

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{b}$$

(Harmita, 2004)

Limit kuantitasi; *Limit of Quantitation* (LOQ) :

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_b}{b}$$

(Harmita, 2004)

3. Perhitungan Uji Perolehan Kembali(% *Recovery*)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi terukur}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

(Lestari, 2014)

4. Perhitungan Koefisien Variasi(KV) atau RSD

Rata-rata :

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

Simpangan deviasi :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

Koefisien variasi :

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

(Harmita, 2004)

5. Perhitungan % diff

$$\% \text{ diff} = \frac{\text{Konsentrasi terukur} - \text{Konsentrasi sebenarnya}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\% \quad (\text{Lestari, 2014})$$

DAFTAR SINGKATAN

<i>% diff</i>	: Presentase perbedaan hasil terukur dengan hasil sebenarnya dibandingkan dengan hasil sebenarnya
<i>% recovery</i>	: Efisiensi ekstraksi dari proses analisis; dinyatakan sebagai presentase terhadap konsentrasi yang diketahui setelah sampel diekstraksi dan diproses
Cs	: Sikloserin
DOTS	: <i>Directly Observed Treatment Short-Course</i>
E	: Etambutol
Eto	: Etionamid
H	: 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.
INH	: Isoniazid
KEM	: Konsentrasi Efektif Minimum
Kn	: Kanamisin
KTM	: Konsentrasi Toksik Minimum
KV	: Koefisien Variasi; Simpangan baku relatif
Lfx	: Levofloksasin
LOD	: <i>Limit of Detection</i> ; Batas deteksi; Jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko
LOQ	: <i>Limit of Quantitation</i> ; Batas kuantitasi; Kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.
M.tb	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIC	: <i>Minimal Inhibitory Concentration</i> ; Konsentrasi Hambat Minimum
N	: Jumlah plat teoritis
OAT	: Obat Anti Tuberkulosis

r^2	: Koefisien korelasi; Linearitas dari garis regresi (2 set data)
r	: Koefisien determinasi; rasio dari variasi yang dijelaskan terhadap variasi keseluruhan.
R	: Rifampisin
S	: Streptomisin
SD	: Simpangan baku
SSP	: Sistem Syaraf Pusat
TB/TBC	: Tuberkulosis
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>
Z	: Pirazinamid