

**PENGARUH ATURAN MAKAN OBAT TERHADAP KADAR ISONIAZID  
DALAM PLASMA DARAH PASIEN TUBERKULOSIS**



**Oleh:**

**Janyarsi Tambuli  
19133761A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2017**

**PENGARUH ATURAN MAKAN OBAT TERHADAP KADAR ISONIAZID  
DALAM PLASMA DARAH PASIEN TUBERKULOSIS**

**SKRIPSI**

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai  
Derajat Sarjana Farmasi  
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi*

**Oleh :**

**Janyarsi Tambuli  
19133761A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2017**

**PENGESAHAN SKRIPSI**  
Berjudul

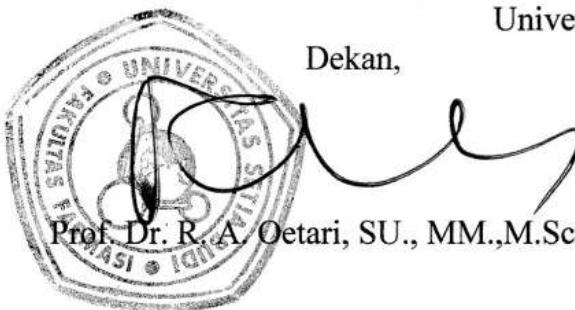
**PENGARUH ATURAN MAKAN OBAT TERHADAP KADAR ISONIAZID  
DALAM PLASMA DARAH PASIEN TUBERKULOSIS**

**Oleh :**  
**Janyarsi Tambuli**  
**19133761A**

Dipertahankan dihadapkan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 7 Agustus 2017

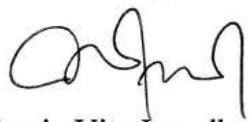
Mengetahui  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi

Dekan,



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

Pembimbing



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

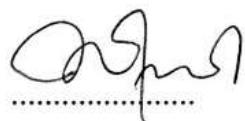
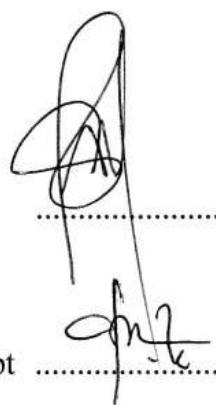
Pembimbing pendamping,



Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt

Penguji:

- 1 Iswandi, M.Farm., Apt .....
- 2 Dwi Ningsih, M.Farm., Apt .....
- 3 Opstaria Saptarini, S.Farm., M.Si., Apt .....
- 4 Lucia Vita Inandha Dewi, M.Sc., Apt .....



## HALAMAN PERSEMBAHAN

*Sebab siapakah Allah selain dari TUHAN, dan siapakah gunung batu selain dari Allah kita? Allah, Dialah yang menjadi tempat pengungsianku yang kuat dan membuat jalanku rata; yang membuat kakiku seperti kaki rusa dan membuat aku berdiri di bukit.*

**2 Samuel 22:32-34**

*Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur.*

**Filipi 4 :6**

*Karya ini aku persembahkan untuk :*

*Tuhan Yesus Kristus*

*Bapak, mama, adik dan keluarga besar*

*Sahabat-sahabatku*

*Almamaterku*

*Bangsa dan negaraku*

## 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 oleh naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

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

Surakarta, Agustus 2017



Janyarsi Tambuli

## KATA PENGANTAR

Puji syukur pada Tuhan Yesus Kristus atas berkat dan kasih-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“PENGARUH ATURAN MAKAN OBAT TERHADAP KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN TUBERKULOSIS”**.

Tulisan ini disusun untuk memenuhi persyaratan tugas akhir pendidikan yang dijalani penulis untuk memperoleh Gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi IlmuFarmasi Universitas Setia Budi.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini telah mendapat banyak bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA. Selaku rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. Selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
3. Lucia Vita Inandha Dewi, M.Sc., Apt. Selaku dosen pembimbing utama dan Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt. Selaku pembimbing pendamping yang telah bersedia meluangkan waktu, memberi saran, nasihat dan semangat selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
4. Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt dan Iswandi, M.Si., Apt. Sebagai penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberi masukan untuk menyempurnakan skripsi ini.
5. Segenap dosen, karyawan, dan staff Laboratorium Fakultas Universitas Setia Budi yang telah memberikan fasilitas dan bantuan selama penelitian.
6. Segenap karyawan perpustakaan Universitas yang telah menyediakan fasilitas dan refrensi buku-buku untuk menunjang dan membantu kelancaran dan selesaiannya skripsi.
7. Bapak, mama, adik dan seluruh keluarga besar yang telah memberikan dukungan moril, semangat, doa dan kasih sayang yang diberikan.

8. Teman satu skripsi Dewi dan Nadia, terimakasi untuk kerjasma dan bantuannya.
9. Sahabat-sahabatku desy, riris, meme, linda, mariya, kiki, risma, mila dan ajeng yang terus memberi semangat, masukan, hiburan dan selalu mendengarkan keluh kesah selama penyusunan skripsi.
10. Mbak fitri, pak jadmiko, pak asik, pak basir, mbak cinta, dan pak tekno yang selalu menjawab berbagai pertanyaan yang tidak diketahui penulis.
11. Teman-teman di laboratorium yang membantu dalam pengoprasiian alat laboratorium.
12. Semua pihak yang terlibat dalam penyusunan skripsi ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan sara dan kritik yang bersifat membangun untuk memperbaiki skripsi ini, akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang mempelajarinya.

Surakarta, 07 Agustus 2017

Janyarsi Tambuli

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
LAMPIRAN .....	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan penelitian .....	3
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Tuberkulosis .....	5
B. Isoniazid .....	5
1. Monografi.....	6
2. Mekanisme kerja .....	6
3. Farmakokinetika.....	7
C. Interaksi Obat .....	8
1. Interaksi dan mekanisme interaksi.....	8
1.1 Interaksi farmasetika .....	8
1.2 Interaksi farmakokinetika .....	8
1.3 Interaksi farmakodinamik .....	9
D. Makanan .....	9
E. Penetapan Kadar Obat Dalam Plasma.....	12
F. Kromatografi .....	15
1. Penggunaan kromatografi .....	15

2.	Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) .....	15
3.	Cara Kerja KCKT .....	16
4.	Komponen-Komponen alat KCKT .....	17
4.1	Wadah fase gerak .....	17
4.2	Pompa .....	17
4.3	Injektor .....	17
4.4	Kolom .....	18
4.5	Detektor .....	18
4.6	Integrator .....	18
5.	Teknik peralatan dalam KCKT .....	19
5.1	Sitem elusi isokratik .....	19
5.2	Sistem elusi gradien .....	19
6.	Fase gerak .....	19
G.	Landasan Teori .....	20
H.	Hipotesis .....	21
BAB III METODE PENELITIAN .....		22
A.	Populasi dan Sampel .....	22
1.	Kriteria inklusi .....	22
2.	Kriteria eksklusi .....	22
3.	Cara pengambilan sampel .....	22
B.	Variabel Penelitian .....	23
1.	Identifikasi variabel utama .....	23
2.	Klasifikasi variabel utama .....	23
3.	Definisi oprasional variabel utama .....	24
C.	Alat dan bahan .....	24
1.	Alat .....	24
2.	Bahan .....	25
D.	Jalannya Penelitian .....	25
1.	Pembuatan larutan induk isoniazid .....	25
2.	Penetapan panjang gelombang analisis .....	25
3.	Pembuatan fase gerak .....	25
4.	Optimasi kondisi analisis .....	25
4.1	Pemilihan fase gerak dan kecepatan aliran untuk analisis .....	25
4.2	Pengaruh rifampisin terhadap analisis .....	26
5.	Preparasi sampel isoniazid di dalam plasma darah .....	26
6.	Validasi metode .....	27
6.1	Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linieritas .....	27
6.2	Penentuan <i>LOD</i> dan <i>LOQ</i> .....	27
6.3	Uji selektivitas .....	27
6.4	Uji akurasi dan perolehan kembali .....	27
6.5	Uji presisi .....	28
7.	Pemeriksaan kadar isoniazid dalam plasma darah pasien tuberkulosis .....	28
E.	Analisis Data .....	29

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	31
4.1 Pemilihan panjang gelombang .....	31
4.2 Optimasi kondisi analisis.....	31
4.2.1 Pemilihan fase gerak dan kecepatan alir.....	31
4.2.2 Pengaruh rifampisin terhadap analisis .....	33
4.3 Validasi Metode.....	33
4.3.1 Kurva kalibrasi dan uji linearitas .....	33
4.3.2 Penentuan LOD dan LOQ.....	34
4.3.3 Uji selektifitas .....	34
4.3.4 Uji akurasi dan perolehan kembali.....	35
4.3.5 Uji presisi .....	36
4.4 Pemeriksaan Kadar Isoniazid Dalam Plasma Darah Pasien Tb ....	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
A. Kesimpulan.....	40
B. Saran .....	40
DAFTAR PUSTAKA .....	41
LAMPIRAN .....	44

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Pemilihan fase gerak untuk analisis.....	26
Tabel 2. Hasil uji akurasi dan perolehan kembali .....	36
Tabel 3. Hasil uji presisi .....	36
Tabel 4. Kadar sampel tuberkulosis .....	37
Tabel 5. Data hasil pemilihan fase gerak untuk isoniazid .....	49
Tabel 6. Data hasil pemilihan laju alir.....	49
Tabel 7. Data hasil pemilihan molaritas .....	49
Tabel 8. Data kurva baku isoniazid .....	50
Tabel 9. Data hasil uji batas deteksi dan batas kuantitas .....	51
Tabel 10. Data hasil uji akurasi dan perolehan kembali .....	53
Tabel 11. Data hasil uji presisi .....	56
Tabel 12. Kadar isoniazid dalam plasma pasien tuberkulosis .....	57

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Struktur isoniazid .....	6
Gambar 2. Tipe injektor katup putara .....	18
Gambar 3. Skema jalanya penelitian.....	30
Gambar 4. Kurva kalibrasi isoniazid.....	34
Gambar 5. Panjang gelombang isoniazid.....	48
Gambar 6. Kurva kalibrasi isoniazid.....	50
Gambar 7. Kromatogram larutan standar isoniazid .....	59
Gambar 8. Kromatogram larutan standar rifampisin .....	60
Gambar 9. Kromatogram plasma kosong.....	61
Gambar 10. Kromatogram plasma dengan penambahan isoniazid dengan konsentrasi $10 \mu\text{g/mL}$ .....	62
Gambar 11. Kromatogram plasma dengan penambahan isoniazid dengan konsentrasi $50 \mu\text{g/mL}$ .....	63
Gambar 12. Kromatogram kurva kalibrasi $1 \mu\text{g/mL}$ .....	64
Gambar 13. Kromatogram kurva kalibrasi $2 \mu\text{g/mL}$ .....	64
Gambar 14. Kromatogram kurva kalibrasi $3 \mu\text{g/mL}$ .....	65
Gambar 15. Kromatogram kurva kalibrasi $4 \mu\text{g/mL}$ .....	65
Gambar 16. Kromatogram kurva kalibrasi $5 \mu\text{g/mL}$ .....	66
Gambar 17. Kromatogram kurva kalibrasi $6 \mu\text{g/mL}$ .....	66
Gambar 18. Kromatogram kurva kalibrasi $7 \mu\text{g/mL}$ .....	67
Gambar 19. Kromatogram uji presisi $1 \mu\text{g/mL}$ .....	68

Gambar 20. Kromatogram uji presisi 4 $\mu\text{g/mL}$ .....	68
Gambar 21. Kromatogram uji presisi 7 $\mu\text{g/mL}$ .....	68
Gambar 22. Kromatogram sampel TB sebelum makan .....	69
Gambar 23. Kromatogram sampel TB setelah makan .....	70

## **LAMPIRAN**

Halaman

Lampiran 1. Sertifikat analisis isoniazid.....	45
Lampiran 2. analisis rifampisin.....	46
Lampiran 3. Surat persetujuan komisi etik .....	47
Lampiran 4. Penentuan panjang gelombang isoniazid.....	48
Lampiran 5. Optimasi fase gerak .....	49
Lampiran 6. Kurva kalibrasi dan uji lieritas.....	50
Lampiran 7. Perhitungan LOD dan LOQ.....	51
Lampiran 8. Data hasil uji akurasi dan perolehan kembali .....	53
Lampiran 9. Data hasil uji presisi .....	56
Lampiran 10. Perhitungan kadar sampel tuberkulosis .....	57
Lampiran 11. Gambar kromatogram.....	59
Lampiran 12. Dokumentasi peneliti.....	71
Lampiran 13. Uji statistik.....	75

## INTISARI

### **TAMBULI, J., 2017, PENGARUH ATURAN MAKAN OBAT TERHADAP KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN TUBERKULOSIS**

Isoniazid adalah derivat asam nikotinat yang berkhasiat tuberkulostatik paling kuat terhadap *mikobakterium tuberkulosis* dan bersifat bakterisid terhadap basil yang sedang tumbuh pesat. Waktu paling baik pemberian isoniazid adalah 1-2 jam sebelum makan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa asupan makanan dapat mengurangi konsentrasi isoniazid dalam plasma serta meningkatkan Tmax isoniazid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aturan makan obat terhadap kadar isoniazid jika dikonsumsi sebelum dan sesudah makan

Penelitian ini menggunakan plasma darah pasien tuberkulosis yang terdiri dari 3 pasien yang mengkonsumsi obat sebelum makan dan 3 pasien mengkonsumsi obat sesudah makan. Dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar isoniazid dalam plasma darah pasien tuberkulosis secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) metode fase balik menggunakan kolom ODS C18 dan sistem elusi isokratik, fase gerak yang digunakan campuran kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) dengan laju alir 1 ml/menit dan pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 230 nm. Data yang diperoleh di analisa dengan *t-test*, menggunakan *paired samples t-test*.

Luas puncak isoniazid pada berbagai konsentrasi dengan koefisien korelasi 0,993 dan dari hasil perhitungan diperoleh persamaan regresi  $y = 34740,43x + 34582,27$ . Dari hasil penelitian ini, didapatkan kadar isoniazid sebelum makan 15,45  $\mu\text{g/mL}$  dan sesudah makan 5,09  $\mu\text{g/mL}$  hal tersebut menunjukkan terjadi perbedaan kadar isoniazid jika digunakan sebelum dan sesudah makan.

---

Kata kunci : Isoniazid, plasma, Aturan makan obat, KCKT

## ABSTRACT

### **TAMBULI, J., 2017, PENGARUH ATURAN MAKAN OBAT TERHADAP KADAR ISONIAZID DALAM PLASMA DARAH PASIEN TUBERKULOSIS**

*Isoniazid is a nicotinic acid derivate and act as the most effecticative tuberculosis agent againts micobacterium tuberculosis and a bacterisid spectrum for a rapit growth bacillus. The best time to administer isoniazid is 1-2 hours before meals. Previous research has shown that dietary intake can reduce the concentration of isoniazid in plasma and elevate Tmax isoniazid. This study aims to determine the effect of drug eating rules on isoniazid levels if consumed before and after meals*

*This study test was using blood plasma tuberculosis patients consisting of 3 patients taking the drug before meals and 3 patients taking the drug after eating. In this research, examination levels of isoniazid in blood plasma tuberculosis patients by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method using a reversed phase C18 ODS column and an isocratic solvent programme, mobile phase was the mixture of potassium dihydrogen phosphate pH 6.2-acetonitrile (99: 1) with a flow rate 1 ml/ min and measurement were done at a wavelength of 230 nm. The data were analyzed by t-test, used paired samples t-test.*

*The peak area of isoniazid at different concentrations with correlation coefficient of 0.993 and from the calculation results obtained regression equation  $y = 34740,43x + 34582,27$ . From the results of this study, it was found that levels isoniazid before meals 15,45  $\mu\text{g/mL}$  and after meals 5,09  $\mu\text{g/mL}$  it shows a differences in isoniazid levels if used before and after meals.*

---

*Key words: Isoniazid, plasma, Drug eating rules, HPLC*

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

TBC merupakan penyakit infeksi paling mematikan yang merupakan penyakit infeksi kronik yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis* (Sudoyo dkk, 2006). Tuberkulosis adalah penyakit infeksi pembunuh nomor satu di dunia. WHO (*World Health Organization*) memperkirakan sekitar 2 miliar orang menderita TB, dan 3 juta orang di dunia meninggal setiap tahunnya karena TB (Herchline, 2007). Di Indonesia, TB merupakan masalah utama kesehatan masyarakat. Jumlah pasien TB di Indonesia merupakan ke-3 terbanyak di dunia setelah India dan Cina dengan jumlah pasien sekitar 10% dari total jumlah TB dunia. Terdapat 2,9 juta kasus TB pada tahun 2012 dengan jumlah kematian karena TB mencapai 410.000 kasus (Depkes, 2014).

Sejalan dengan meningkatnya kasus TB, pada awal tahun 1990-an WHO dan IUATLD (*International Union Against Tuberculosis Lung Diseases*) mengembangkan strategi pengendalian TB yang dikenal sebagai strategi DOTS (*Directly Observed Treatment Short-course*) yang bertujuan untuk menyembuhkan penyakit, mencegah kematian, mencegah kekambuhan, memutuskan rantai penularan dan mencegah terjadinya resistensi kuman terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) (Depkes, 2014).

Obat antituberkulosis (OAT) dibedakan atas obat utama dan obat cadangan. Obat utama antituberkulosis adalah isoniazid (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (ETA), rifampisin (RIF) dan streptomisin sebagai alternatif (Katzung, 2004). Obat-obat ini paling efektif dan paling rendah toksitasnya, tetapi menimbulkan resistensi dengan cepat bila digunakan sebagai obat tunggal. Obat cadangan yaitu asam p-aminosalisilat, sikloserin, kepreomisin, kanamisin dan tetrasiiklin. Obat-obat ini memiliki kegiatan yang lebih lemah dan biasanya hanya digunakan bila terdapat resistensi atau intoleransi terhadap obat-obat utama (Tjay dan Rahardja, 2002)

Isoniazid adalah derivat asam nikotinat yang berkhasiat tuberkulosis paling kuat terhadap *mikobakterium tuberkulosis* dan bersifat bakterisid terhadap basil yang sedang tumbuh pesat (Tjay dan Rahardja, 2002). Isoniazid diabsorsi secara cepat lewat saluran pencernaan dan menghasilkan kadar puncak pada plasma sekitar 3-5  $\mu\text{g/mL}$  dalam 1-2 jam setelah pemberian oral 300 mg isoniazid (Katsung, 2005). Mekanisme kerja isoniazid belum diketahui secara pasti, tetapi ada beberapa hipotesis yang diajukan, diantaranya efek pada lemak, biosintetis asam nukleat dan glikolisis. Ada pendapat bahwa efek utamanya adalah menghambat asam mikolat (*mycolic acid*) yang merupakan unsur penting dinding sel mikobakterium.

Menurut teori isoniazid sebaiknya diminum dalam keadaan perut kosong. Waktu paling baik pemberian isoniazid adalah 1-2 jam sebelum makan. Pada kenyataan di lapangan pemberian isoniazid tidak selalu memperhatikan aturan tersebut. Bila terdapat gangguan saluran pencernaan/lambung, maka isoniazid dapat diminum bersamaan dengan makanan untuk mengurang efek gangguan pencernaan. Isoniazid dapat berinteraksi dengan makanan, sehingga tidak diberikan bersamaan dengan makanan, alkohol, keju dan ikan (IONI).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa asupan makanan dapat mengurangi konsentrasi maksimal isoniazid dalam plasma darah hingga 40,2%. Asupan makanan juga meningkatkan Tmax dari isoniazid hingga 78,1% (Chun lin *et al*, 2014). Komponen makanan dapat mempengaruhi konsentrasi obat dalam serum. Makanan yang tinggi lemak seperti yang direkomendasikan oleh FDA (*Food and drug administration*) akan mengurangi Cmax isoniazid sampai 32-51% dan AUC sampai 12-13% (Peloquin CA *et al*, 1999). Di lain studi pola makan karbohidrat dapat mengurangi Cmax dan AUC isoniazid ke tingkat yang lebih rendah daripada makanan yang tinggi lemak (Zent *et al*, 1995).

Kajian interaksi obat sangat diperlukan karena dapat menyebabkan dua hal penting. Pertama, interaksi obat dapat mengurangi atau bahkan menghilangkan khasiat obat, baik melalui penghambatan penyerapan atau dengan mengangu metabolisme atau distribusi obat tersebut di dalam tubuh. Kedua, interaksi obat yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan (Rodrigues, 2002). Berdasarkan hal

tersebut maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh aturan minum obat terhadap kadar isoniazid pada pasien tuberkulosis.

Isoniazid memiliki gugus kromofor sehingga untuk analisis dapat menggunakan UV dan KCKT. Di dalam struktur isoniazid mempunyai gugus auksokrom  $-\text{NH}_2$ , gugus auksokrom adalah gugus yang dapat meningkatkan daya kerja kromofor sehingga optimal dalam pengikatan.

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter presisi, akurasi, linieritas, selektivitas, dan sensitivitas memenuhi syarat untuk penggunaannya (Harmita, 2006). Saat ini Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel dalam sejumlah bidang.

Kromatografi cair kinerja tinggi memiliki banyak keuntungan antara lain mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, mudah pelaksanaannya, dapat dihindari terjadinya kerusakan bahan yang dianalisis, resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor, kolom dapat digunakan kembali dan mudah melakukan perolehan kembali (Putra, 2004).

Berdasarkan latar belakang di atas peneliti ingin melihat pengaruh aturan makan obat terhadap kadar isoniazid dalam plasma pasien tuberkulosis menggunakan kromatografi cair kinerja.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan dapat dirumuskan permasalahan dalam penelitian ini yaitu apakah aturan makan obat TB akan mempengaruhi kadar isoniazid dalam plasma darah pada pasien tuberkulosis ?

## **C. Tujuan penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aturan makan obat TB terhadap kadar isoniazid dalam plasma darah pada pasien tuberkulosis.

#### **D. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan teknologi (IPTEK), serta mengetahui pengaruh aturan makan obat TB terhadap kadar isoniazid dalam tubuh yang mempengaruhi efikasi obat dan dapat menjadi salah satu refrensi tentang metode yang valid untuk penetapan kadar isoniazid dalam plasma darah menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tuberkulosis**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit kronis, infeksi progresif dengan periode laten setelah infeksi awal, pada umumnya terjadi pada paru. Tuberkulosis adalah penyakit menular yang umumnya disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri aerobik, gram positif lemah, bentuk batang tanpa flagel, tidak menghasilkan spora, tidak menghasilkan toksin. Bakteri ini memiliki panjang dan tinggi yang bervariasi antara 0,3-0,6 dan 1-4 $\mu$ m, memiliki selaput luar sel yang kompleks, pertumbuhannya lambat dan secara genetik homogen. *Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri patogen makrofag intra seluler dengan daerah infeksi yang umumnya berada pada sistem paru (Ducati, 2006).

Tuberkulosis terjadi akibat inhalasi dari droplet yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* yang dilepaskan pada saat batuk atau bersin oleh penderita tuberkulosis aktif, dengan sputum yang mengandung organisme dalam jumlah yang signifikan (The Merck Manual, 2005). Penderita tuberkulosis batuk atau bersin, akan menyebarkan kuman ke udara dalam bentuk percikan dahak (*droplet nuclei*), dimana dalam sekali batuk pasien dapat menghasilkan sekitar 3000 percikan dahak (Depkes, 2014)

Obat anti tuberkulosis adalah obat yang merupakan kombinasi beberapa jenis antibiotik untuk pengobatan tuberkulosis atau disebut dengan tuberkulostatika (Tjay & Rahardja, 2003). Tujuan utama pengobatan pasien tuberkulosis adalah menyembuhkan penyakit, mencegah kematian, mencegah kekambuhan, memutuskan rantai penularan dan mencegah terjadinya resistensi kuman terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) (Depkes, 2014).

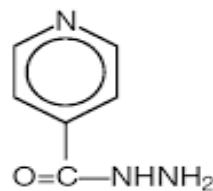
#### **B. Isoniazid**

Isoniazid adalah hidrazid dari asam isonikotinat yang merupakan suatu analog sintetik piridoksin. Isoniazid merupakan antibiotik dengan aktivitas

bakterisid dan bakteriostatik terhadap mikobakterium. Isoniazid atau INH bekerja dengan menghambat sintesa asam mikolinat yang merupakan unsur penting pembentukan dinding sel mikobakterium tuberkulosis.

### 1. Monografi

Isoniazida mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0%  $C_6H_7N_3O$ , dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan (FI, 1979). Isoniazid memiliki struktur kimia sebagai berikut :



**Gambar 1. Struktur isoniazid**

Rumus molekul	: $C_6H_7N_3O$
Berat molekul	: 137,14 g/mol
Pemerian	: Hablur tidak berwarna atau serbuk hablur putih; tidak berbau; rasa agak pahit; terurai perlahan-lahan oleh udara dan cahaya.
Kelarutan	: Mudah larut dalam air; agak sukar larut dalam etanol (95%) <i>P</i> ; sukar larut dalam kloroform <i>P</i> dan dalam eter <i>P</i> .

### 2. Mekanisme kerja

Mekanisme kerja isoniazid belum diketahui secara pasti, tetapi ada beberapa hipotesis yang diajukan, diantaranya efek pada lemak, biosintetis asam nukleat dan glikolisis. Ada pendapat bahwa efek utamanya adalah menghambat asam mikolat yang merupakan unsur penting dinding sel mikobakterium. Isoniazid konsentrasi rendah dapat mencegah perpanjangan rantai asam lemak yang sangat panjang yang merupakan bentuk awal molekul asam mikolat. INH menghilangkan sifat tahan asam dan menurunkan jumlah lemak yang terekstraksi oleh methanol dari mikobakterium. Isoniazid secara *in vitro* memiliki kadar hambat minimum sekitar 0,025-0,05  $\mu$ g/mL. Organisme yang rentan terhadap isoniazid adalah *Mycobacterium tuberculosis* dan menghambat beberapa stain *M. Kansasii*. Efek bakterisidnya hanya terlihat pada kuman yang sedang tumbuh aktif

(Istantoro dan Setiabudy, 2007). Pada bakteri yang semi dorman, isoniazid bersifat bakteriostatik (Martindale, 2007).

Efek nonterapi dari isoniazid adalah hipersensitivitas, reaksi hematologik, neuritis perifer, kerusakan hati dan lain-lain (Istantoro dan Setiabudy, 2007). Efek samping yang terpenting adalah defisiensi piridoksin yang mengakibatkan neuritis perifer. Piridoksin hidroklorida dengan dosis 10-50 mg biasanya diberikan sebagai profilaksis dari neuritis perifer dengan penggunaan isoniazid (Martindale, 2007). Sampai saat ini isoniazid merupakan salah satu dari obat antituberkulosis yang efektif namun penggunaannya secara tunggal akan meningkatkan resiko resistensi (Wolff, M., 1994).

### **3. Farmakokinetika**

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

Isoniazid dimetabolisme melalui reaksi asetilasi di hati menjadi asetil isoniazid, kemudian mengalami hidrolisis menjadi asam isonikotinat dan monoasetilhidrazin. Asam isonikotinat berkonjugasi dengan glisin menjadi isonikotinil glisin. Kecepatan asetilasi pada tiap orang berbeda-beda bergantung dari genetiknya, dibedakan menjadi asetilator cepat dan lambat. Waktu paruh isoniazid pada basetilator cepat berkisar dari 45 sampai 80 menit, sedang pada asetilator lambat sekitar 140 sampai 200 menit. Pada asetilator lambat cenderung mengakumulasi kadar isoniazid plasma yang tinggi dibandingkan dengan asetilator cepat (Wilson & Gisvold, 1982).

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

### **C. Interaksi Obat**

Interaksi obat adalah peristiwa dimana aksi suatu obat diubah atau dipengaruhi oleh obat lain yang diberikan bersamaan. Terjadinya peristiwa interaksi harus selalu dipertimbangkan dalam pengobatan, ketika dua obat atau lebih diberikan secara bersamaan atau hampir bersamaan (Depkes, 2003).

Interaksi obat mempunyai 2 macam pengertian yaitu berdasarkan akibat, interaksi obat merupakan peristiwa manakala efek obat tertentu diubah oleh obat lain yang diberikan sebelum atau bersama-sama dengannya dan berdasarkan perantara (mekanisme kerja). Interaksi obat merupakan peristiwa yang terjadi jika dua obat diberikan bersama-sama, saling mempengaruhi proses kinetika dan atau farmakodinamika masing-masing obat. Dari pengertian tersebut akibat interaksi dapat berupa pergeseran kinerja farmakokinetik dan atau farmakodinamik obat, penyebab interaksi mungkin faktor peringkat dosis rendah dan atau lama perlakuan antar sampel (Donatus, 1994).

#### **1. Interaksi dan mekanisme interaksi**

Interaksi obat berdasarkan mekanismenya dibagi menjadi 3 golongan besar, yaitu interaksi farmasetika, interaksi farmakokinetika dan interaksi farmakodinamika (Joenoes, 1998).

**1.1 Interaksi farmasetika.** Interaksi farmasetika merupakan interaksi *in vivo*. Interaksi ini sangat bergantung pada sifat-sifat fisik obat dan juga bentuk sediaan yang diberikan. Interaksi ini terjadi pada waktu pencampuran, yakni sebelum obat masuk ke dalam tubuh (Joenoes, 1998).

**1.2 Interaksi farmakokinetika.** Interaksi farmakokinetika terjadi bila obat presipitan mempengaruhi atau mengubah proses absorpsi, distribusi,

metabolisme dan ekskresi dari obat. Mekanisme interaksi ini dapat dibedakan sesuai dengan proses-proses biologiknya (kinetik) yaitu :

**1.2.1 Interaksi dalam proses absorpsi.** Interaksi dalam proses absorpsi dapat terjadi dengan berbagai cara misalnya penurunan mortalitas gastrointestinal oleh karena makanan juga dapat mengubah absorpsi obat tertentu, misalnya antibiotika tertentu akan menurun absobsinya bila diberikan bersama dengan makanan.

**1.2.2 Interaksi dalam proses distribusi.** Interaksi dalam proses distribusi terjadi terutama obat dengan ikatan protein yang lebih kuat menggusur obat lain dengan ikatan protein yang lebih lemah dari tempat ikatannya pada protein plasma. Kadar obat bebas yang tergusur ini akibatnya akan lebih tinggi pada darah dengan konsekuensinya, terutama terjadi peningkatan efek toksik.

**1.2.3 Interaksi obat dalam proses metabolisme.** Interaksi obat dalam proses metabolisme dapat terjadi dengan dua kemungkinan yaitu pemicu enzim (*enzyme induction*) yakni suatu obat dapat memacu metabolisme obat lain sehingga mempercepat eliminasi obat tersebut dan penghambatan enzime yakni metabolisme suatu obat dihambat oleh obat lain.

**1.2.4 Interaksi obat dalam proses ekskresi.** Interaksi obat atau metabolitnya melalui organ ekskresi di ginjal dapat dipengaruhi oleh obat lain.

**1.3 Interaksi farmakodinamik.** Interaksi farmakodinamika dapat dibedakan menjadi interaksi langsung dan interaksi tidak langsung. Interaksi langsung terjadi apabila dua obat atau lebih bekerja pada tempat yang berbeda tetapi hasil efek akhir sama atau hampir sama. Interaksi dua obat pada tempat yang sama dapat tampil sebagai antagonisme atau sinergisme. Obat-obat dengan efek akhir yang sama atau hampir sama, walaupun tempat kerja atau reseptornya berlainan, kalau diberikan bersamaan akan memberikan efek yang saling memperkuat.

#### **D. Makanan**

Makanan merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi interaksi obat. Pengaruh makanan terhadap kerja obat masih sangat kurang. Karena itu,

pada banyak bahan obat masih belum jelas bagaimana pengaruh pemberian makanan pada saat yang sama pada kinetika obat. Pada sejumlah senyawa makanan menyebabkan peningkatan, penundaan, dan penurunan absorpsi obat (Mutschler, 1999). Makanan dapat berikatan dengan obat, sehingga mengakibatkan absorpsi obat berkurang atau lebih lambat. Sebuah contoh diskusi tentang makanan yang berikatan dengan obat adalah interaksi tetrasiplin dengan produk-produk dari susu. Akibatnya adalah penurunan konsentrasi tetrasiplin dalam plasma. Oleh karena adanya efek pengikatan ini, maka tetrasiplin harus dimakan satu jam sebelum atau 2 jam sesudah makan dan tidak boleh dimakan dengan susu (Hayes et al., 1996).

Dasar yang menentukan apakah obat diminum sebelum, selama atau setelah makan tentunya adalah karena absorpsi, ketersediaan hayati serta efek terapeutik obat bersangkutan, yang amat tergantung dari waktu penggunaan obat tersebut serta adanya kemungkinan interaksi obat dengan makanan itu sendiri. Kemungkinan-kemungkinan yang menyebabkan dapat terjadinya interaksi obat dengan makanan adalah perubahan motilitas lambung dan usus terutama kecepatan pengosongan lambung dari saat masuknya makanan, perubahan pH, sekresi asam serta produksi empedu, perubahan suplai darah di daerah splanchnicus dan di mukosa saluran cerna, dipengaruhinya absorpsi obat oleh proses adsorpsi dan pembentukan kompleks, dipengaruhinya proses transport aktif obat oleh makanan, perubahan biotransformasi dan eliminasi (Widianto, 1989).

Faktor yang mempengaruhi interaksi obat dan makanan antara lain:

### **1. Pengosongan lambung**

Pada kasus tertentu misalnya setelah pemberian laksansia atau penggunaan preparat retard, maka di usus besar pun dapat terjadi absorpsi obat yang cukup besar. Karena besarnya peranan usus halus dalam hal ini, tentu saja cepatnya makanan masuk ke dalam usus akan amat mempengaruhi kecepatan dan jumlah obat yang diabsorpsi. Peranan jenis makanan juga berpengaruh besar di sini. Jika makanan yang dimakan mengandung komposisi 40% karbohidrat, 40% lemak dan 20% protein maka walaupun pengosongan lambung akan mulai terjadi setelah sekitar 10 menit. Proses pengosongan ini baru berakhir setelah 3 sampai 4 jam.

Dengan ini selama 1 sampai 1,5 jam volume lambung tetap konstan karena adanya proses-proses sekresi.

## 2. Komponen makanan

Protein sebagai contoh, dalam penggunaan Levadopa untuk mengendalikan tremor pada penderita Parkinson. Akibatnya, kondisi yang diobati mungkin tidak terkendali dengan baik. Hindari atau makanlah sesedikit mungkin makanan berprotein tinggi (Harkness, 1989).

Lemak Keseluruhan dari pengaruh makan lemak pada metabolisme obat adalah bahwa apa saja yang dapat mempengaruhi jumlah atau komposisi asam lemak dari fosfatidilkolin mikrosom hati dapat mempengaruhi kapasitas hati untuk memetabolisasi obat. Kenaikan fosfatidilkolin atau kandungan asam lemak tidak jenuh dari fosfatidilkolin cenderung meningkatkan metabolism obat (Gibson, 1991).

Karbohidrat tampaknya mempunyai efek sedikit pada metabolism obat, walaupun banyak makan glukosa, terutama sekali dapat menghambat metabolism barbiturate, dan dengan demikian memperpanjang waktu tidur. Kelebihan glukosa ternyata juga mengakibatkan berkurangnya kandungan sitokrom P-450 hati dan memperrendah aktivitas bifenil-4-hidroksilase (Gibson, 1991).

Vitamin merupakan bagian penting dari makanan dan dibutuhkan untuk sintesis protein dan lemak, keduanya merupakan komponen vital dari system enzim yang memetabolisasi obat. Tidak mengherankan bahwa perubahan dalam level vitamin, terutama defisiensi, menyebabkan perubahan dalam kapasitas memetabolisasi obat.

Mineral merupakan unsur logam dan bukan logam dalam makanan untuk menjaga kesehatan yang baik. Unsur – unsur yang telah terbukti mempengaruhi metabolisme obat ialah: besi, kalium, kalsium, magnesium, zink, tembaga, selenium, dan iodium. Makanan yang tidak mengandung magnesium juga secara nyata mengurangi kandungan lisofosfatidilkolin, suatu efek yang juga berhubungan dengan berkurangnya kapasitas metabolisme hati. Besi yang berlebih dalam makanan dapat juga menghambat metabolisme obat. Kelebihan tembaga mempunyai efek yang sama seperti defisiensi tembaga, yakni

berkurangnya kemampuan untuk memetabolisme obat dalam beberapa hal. Jadi ada level optimum dalam tembaga yang ada pada makanan untuk memelihara metabolism obat dalam tubuh (Gibson, 1991).

### **3. Ketersediaan hayati**

Penggunaan obat bersama makanan tidak hanya dapat menyebabkan perlambatan absorpsi tetapi dapat pula mempengaruhi jumlah yang diabsorpsi (ketersediaan hayati obat bersangkutan). Penisilamin yang digunakan sebagai basis terapeutika dalam menangani reumatik, jika digunakan segera setelah makan, ketersediaan hayatinya jauh lebih kecil dibandingkan jika tablet tersebut digunakan dalam keadaan lambung kosong. Ini akibat adanya pengaruh laju pengosongan lambung terhadap absorpsi obat (Gibson, 1991).

## **E. Penetapan Kadar Obat Dalam Plasma**

Penetapan kadar obat dalam plasma adalah salah satu bagian dari pemantauan kadar obat di dalam darah. Teknik ini biasa digunakan klinis untuk mengoptimalkan dosis obat dengan memberikan dosis yang ditetapkan berdasarkan konsentrasi target dengan cara mengukur kadar obat dalam darah dan bila perlu melakukan penyesuaian dosis. Pementauan kadar obat dalam darah ini bertujuan untuk membantu meningkatkan penggunaan obat yang lebih rasional baik keamanan dan efektifitas dosis pada individu penderita.

Penelitian farmakokinetik melibatkan penentuan kadar obat dalam sampel biologis. Metode analisis yang digunakan untuk penentuan kadar obat dalam sampel biologis merupakan hal yang sangat penting dalam evaluasi dan interpretasi data farmakokinetika. Berbagai sampel biologis dapat diambil untuk penentuan kadar dalam tubuh untuk penelitian farmakokinetik sebagai contoh darah, urin, saliva, jaringan tubuh, cairan *blister*, cairan spinal dan cairan sinovial.

Pengukuran konsentrasi obat dalam darah, serum atau plasma merupakan pendekatan paling baik untuk memperoleh profil farmakokinetika obat dalam tubuh (Shargel, Wu pong & Yu, 2004). Plasma adalah suatu cairan kompleks yang berfungsi sebagai media transformasi untuk zat-zat yang diangkut dalam darah. Konstituen plasma antara lain air, elektrolit, nutrien, zat sisa, gas, hormon,

dan protein plasma (Ganong, 2011). Plasma diperoleh dari supernata darah yang telah ditambahkan antikoagulan kemudian disentrifugasi (Shargel; Wu Pong; Yu, 2004).

Penentuan kadar suatu obat dalam plasma merupakan hal yang kompleks disebabkan plasma merupakan suatu matriks yang kompleks. Perlakuan awal terhadap sampel meliputi isolasi obat yang akan ditentukan dari sampel matriks biologis harus dilakukan. Preparasi sampel plasma agar dapat memisahkan atau mengisolasi obat diupayakan menggunakan prosedur seminimal mungkin untuk menghindari kehilangan obat yang akan ditentukan di dalam plasma. Semakin panjang tahapan prosedur untuk preparasi sampel plasma hingga proses memisahkan atau mengisolasi obat maka semakin besar kemungkinan hilangnya obat yang akan ditentukan.

Evans( 2004) menyatakan beberapa cara preparasi sampel untuk penetapan kadar obat dalam plasma, yakni:

### **1. Pengendapan protein plasma**

Contoh zat pengendap protein : asam tungstat, amonium sulfat, tricloro acetic acid (TCA), asam perklorat, metanol dan asetonitril. Protein dapat diendapkan karena memiliki berbagai sifat diantaranya bersifat sebagai amfoter yakni memiliki 2 muatan yang berlainan dalam 1 molekul, atau yang dikenal juga sebagai zwitter ion. Sifat ini membuat potein memiliki muatan yang berbeda pada pH yang berbeda pula. Akibatnya protein dapat larut pada rentang pH tertentu dimana protein bermuatan.

Suatu saat di pH tertentu protein akan mencapai titik isoelektrik, yakni pH dimana jumlah total muatan protein sama dengan nol (muatan positif sebanding dengan muatan negatif), hal ini akan mempengaruhi kelarutan protein. Pada titik isoelektrik, kelarutan protein sangat rendah, sehingga potein dapat mengendap.

Selain itu, protein juga dapat membentuk ikatan dengan logam dimana beberapa asam amino dapat terikat pada satu logam sehingga molekulnya menjadi besar, beratnya juga menjadi besar sehingga potein mengendap. Terdapat juga beberapa sifat lain yang berhubungan dengan presipitasi protein ini yang dijelaskan pada mekanisme pengendapan oleh masing-masing reagen.

Penambahan larutan organik seperti metanol ataupun asetonitril pada larutan protein dalam air akan menurunkan KD (Konstanta Dielektrik) pelarut/air yang meningkatkan tarikan antara molekul-molekul bermuatan dan memfasilitasi interaksi elektrostatik protein. Pelarut organik ini juga akan mengantikan beberapa molekul air di sekitar daerah hidrofob dari permukaan protein yang berasosiasi dengan protein sehingga menurunkan konsentrasi air dalam larutan dengan demikian kelarutan protein akan menurun dan memungkinkan terjadinya pengendapan. Penggunaan metanol dan asetonitril mempunyai suatu keuntungan karena kompatibilitasnya dengan berbagai eluen yang digunakan dalam metode HPLC.

## 2. Ekstraksi padat-cair (*Solid-phase extraction*)

Ekstraksi padat-cair menggunakan cartridge khusus untuk memisahkan obat dari sampel dengan volume relatif lebih kecil (0,5-1 mL) yang tersedia secara komersial dengan harga yang cukup mahal.

## 3. Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair merupakan suatu metode yang paling banyak digunakan karena relatif cepat, simpel, dan murah dibandingkan dengan ekstraksi padat-cair. Ekstraksi ini menggunakan pelarut pengekstraksi diikuti proses pemekatan obat yang akan dianalisis. Pemilihan pelarut pengekstraksi dalam ekstraksi cair-cair harus didasarkan pada sifat fitokimia obat maupun metabolit yang akan diisolasi. Berbagai faktor dapat menjadi pertimbangan dalam seleksi pelarut yang akan digunakan antara lain:

- Tidak bercampur dengan air.
- Mempunyai kemampuan molarutkan obat yang diinginkan dalam jumlah yang besar sehingga memberikan nilai recovery yang besar.
- Mempunyai titik didih yang relatif rendah sehingga waktu evaporasi pelarut dapat lebih singkat.
- Sedapat mungkin volume yang digunakan untuk ekstraksi adalah minimal sehingga akan menekan biaya yang dikeluarkan.

- Jika memungkinkan gunakan pelarut dengan berat jenis yang lebih kecil dari berat jenis air sehingga proses pemisahan pelarut organik akan lebih mudah karena pelarut organik akan berada pada lapisan atas.

## **F. Kromatografi**

Kromatografi adalah istilah umum untuk berbagai cara pemisahan berdasarkan partisi cuplikan antara fase yang bergerak, dapat berupa gas atau zat cair. Fase diam dapat berupa zat cair atau padat (Edward & Stevenson, 1991).

### **1. Penggunaan kromatografi**

Menurut Gritter (1991), penggunaan kromatografi antara lain yaitu: Pemakaian untuk tujuan kualitatif menggunakan ada atau tidak adanya senyawa tertentu dalam cuplikan. Pemakaian untuk tujuan kuantitatif menunjukkan banyaknya masing-masing komponen campuran. Pemakaian untuk tujuan preparatif untuk memperoleh komponen campuran dalam jumlah memadai dalam keadaan murni.

### **2. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)**

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi karena didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi dan detektor yang sangat sensitif dan beragam sehingga mampu menganalisa berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Ditjen POM, 1995).

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang antara lain; farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer dan industri makanan (Rohman, 2007).

Tujuan KCKT adalah untuk mendapatkan pemisahan yang baik dalam waktu relatif cepat. Hal-hal yang perlu diperhatikan untuk mencapai maksud dan tujuan analisis antara lain dengan pemilihan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campuran yang sesuai untuk komponen yang digunakan, pemilihan

kolom yang sesuai dengan pelarut pengembangnya, penggunaan detektor yang memadai dan perlunya pengetahuan dasar KCKT yang baik serta pengalaman dan keterampilan kerja yang baik (Mulja & Suharman, 1991).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik maupun biologis, analisis ketidakmurnian (impurities) dan analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (nonvolatile). KCKT paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat dan protein-protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat dan lain-lain (Rohman, 2007).

Menurut Putra (2007), kelebihan KCKT antara lain: mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, resolusinya baik, mudah melaksanakannya, kecepatan analisis dan kepekaannya tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis, dapat digunakan bermacam-macam detektor, kolom dapat digunakan kembali, mudah melakukan rekoveri cuplikan, tekniknya tidak begitu tergantung pada keahlian operator dan reproduksibilitasnya lebih baik, instrumennya memungkinkan untuk bekerja secara automatis dan kuantitatif, waktu analisisnya umumnya singkat, kromatografi cair preparatif memungkinkan dalam skala besar, dan ideal untuk molekul bedar dan ion.

### **3. Cara Kerja KCKT**

Prinsip kerja KCKT adalah dengan bantuan pompa fase gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fase gerak dengan cara penyuntikkan. Pemisahan komponen-komponen campuran terjadi di dalam kolom. Terdapat perbedaan kekuatan interaksi antara solute dan fase diam akan bertahan lebih lama di dalam kolom. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram (Hendayana 2006). KCKT mempunyai beberapa keuntungan jika dibandingkan kromatografi cair tradisional antara lain cepat, kolom dapat dipakai berulang, mudah memperoleh kembali cuplikan dan dapat menganalisis senyawa dengan berat molekul atau titik didih tinggi (Anonim 1995).

#### 4. Komponen-Komponen alat KCKT

**4.1 Wadah fase gerak.** Wadah fase gerak terbuat dari bahan yang inert terhadap fase gerak. Bahan yang umumnya digunakan adalah gelas dan baja anti karat. Daya tampung tandon harus lebih besar dari 500 mL, yang dapat digunakan selama 4 jam untuk kecepatan alir yang umumnya 1-2 mL/menit (Putra, 2007).

**4.2 Pompa.** Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut yakni : pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umumnya dipakai untuk pompa adalah glas, baja tahan karat, teflon dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberi tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirka fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu : pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan (Rohman, 2007).

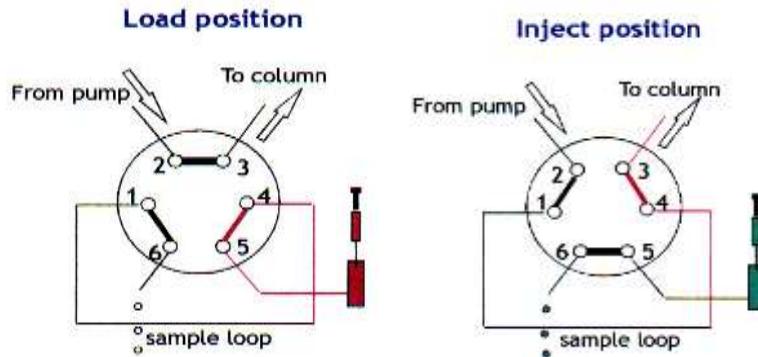
**4.3 Injektor.** Cuplikan yang akan dianalisis dimasukkan ke bagian ujung kolom, harus dengan disturbansi yang minimum dari material kolom. Ada 2 model umum yaitu: *Stop Flow* dan *Solvent Flowing*. Menurut putra (2007) ada tiga tipe dasar injektor yang dapat digunakan yaitu:

**4.3.1 Hentikan aliran/stop flow.** Aliran dihentikan, injeksi dilakukan pada kinerja atmosfir, sistem tertutup, dan aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi di dalam aliran kecil dan resolusi tidak dipengaruhi.

**4.3.2 Septum.** Injektor-injektor langsung ke aliran fase gerak umumnya sama dengan yang digunakan pada kromatografi gas. Injektor ini dapat digunakan pada kinerja sampai 60-70 atmosfir. Septum ini tidak tahan dengan semua pelarut-pelarut kromatografi cair. Disamping itu, partikel kecil dari septum yang terkoyak (akibat jarum injektor) dapat menyebabkan penyumbatan.

**4.3.3 Katup putaran (loop valve).** Tipe injektor ini umumnya digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar dari pada 10 $\mu$ L dan sekarang digunakan dengan cara automatis (dengan adaptor khusus, volume-volume lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual). Pada posisi LOAD, sampel loop

(cuplikan dalam putaran) diisi pada tekanan atmosfir. Katup difungsikan, maka cuplikan di dalam putaran akan bergerak ke dalam kolom.



**Gambar 2. Tipe injektor katup putara**

**4.4 Kolom.** Kolom merupakan jantung kromatografi. Keberhasilan atau kegagalan analisis bergantung pada pilihan kolom dan kondisi kerja yang tepat. Menurut Johnson dan Stevenson (1991) kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok :

**4.4.1 Kolom analitik.** Garis tengah-dalam 2-6 mm. Panjang bergantung pada jenis kemasan, untuk kemasan partikel biasanya panjang kolom 50-100 cm, untuk kemasan mikropartikel berpori biasanya 10-30 cm.

**4.4.2 Kolom preparatif.** Umumnya bergaris tengah 6 mm atau lebih besar dan panjang 25-100 cm.

**4.5 Detektor.** Detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen cuplikan dalam aliran yang keluar dari kolom. Detektor-detektor yang baik memiliki sensitifitas yang tinggi, gangguan (noise) yang rendah, kissar respons linier yang luas dan memberi tanggapan/respon untuk semua tipe senyawa. Kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh (Putra, 2007).

Detektor yang merupakan tulang punggung kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) ialah detektor UV 254 nm (Johnson & Stevenson, 1991).

**4.6 Integrator.** Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Macam integrator ada dua yaitu :

**4.6.1 Integrator piringan.** Bekerja secara mekanik.

**4.6.2 Integrator digital atau elektronik.** Integrator elektronik mengubah sinyal kromatografi menjadi bentuk angka otomatis dan sangat tepat (Jhoson & Stevenson, 1991).

## 5. Teknik peralatan dalam KCKT

Menurut Putra (2007), elusi pada KCKT dapat dibagi menjadi dua sistem yaitu :

**5.1 Sitem elusi isokratik.** Pada sistem ini, elusi dilakukan dengan satu macam atau lebih fase gerak dengan perbandingan tetap.

**5.2 Sistem elusi gradien.** Elusi dilakukan dengan campuran fase gerak yang perbandingannya berubah-ubah dalam waktu tertentu. Elusi gradien didefinisikan sebagai penambahan kekuatan fase gerak selama suatu analisis kromatografi berlangsung. Pengaruh yang menguntungkan dari elusi gradien adalah memperpendek waktu analisis senyawa-senyawa yang secara kuat ditahan di dalam kolom (Putra, 2007).

## 6. Fase gerak

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam dan sifat komponen-komponen sampel. Fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Rohman, 2007).

Kromatografi cair komposisi pelarut atau fase gerak adalah satu variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat keragaman yang luas dari fase gerak yang digunakan dalam semua mode KCKT, tetapi ada beberapa sifat-sifat yang diinginkan yang mana umumnya harus dipenuhi oleh semua fase gerak.

Menurut putra (2007), fase gerak harus : murni tidak ada pencemar atau kontaminan, tidak bereaksi dengan pengemas, sesuai dengan detektor, melarutkan cuplikan, mempunyai viskositas rendah, mudah recoveri cuplikan, bila diinginkan, tersedia diperdagangan dengan harga yang pantas

Umumnya, pelarut-pelarut dibuang setelah digunakan karena prosedur pemurnian kembali membosankan dan mahal. Semua persyaratan dia atas, 4 persyaratan pertama adalah yang paling penting (Putra, 2007). Gelembung udara yang ada harus dihilangkan dari pelarut dengan cara *degassing*, karena udara yang terlarut keluar melewati detektor dapat menghasilkan banyak noise sehingga data tidak dapat digunakan (Putra, 2007).

#### **G. Landasan Teori**

Makanan merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi interaksi obat. Pengaruh makanan terhadap kerja obat masih sangat kurang. Pada banyak bahan obat masih belum jelas bagaimana pengaruh pemberian makanan pada saat yang sama pada kinetika obat. Pada sejumlah senyawa makanan menyebabkan peningkatan, penundaan dan penurunan absobsi obat (Mutschler, 1999). Makanan dapat berikatan dengan obat, sehingga mengakibatkan absobsi obat berkurang atau lebih lambat. Penelitian serupa menjelaskan interaksi tetrasiklin dengan produk dari susu, dapat menurunkan konsentrasi tetrasiklin dalam plasma jika diberikan bersamaan dengan susu. Karena itu tetrasiklin harus dimakan satu jam sebelum atau 2 jam sesudah makan dan tidak boleh dimakan dengan susu (Hayes *et.al.*, 1996).

Isoniazid adalah hidrazid dari asam isonikotinat yang merupakan suatu analog sintetik piridoksin. Isoniazid merupakan antibiotik dengan aktifitas bakterisid dan bakteriostatik terhadap mikobakterium. Isoniazid atau INH bekerja dengan menghambat sintesa asam mikolinat yang merupakan unsur penting pembentukan dinding sel mikobakterium tuberkulosis.

Isoniazid diabsobsi secara cepat lewat saluran pencernaan dan menghasilkan kadar puncak pada plasma sebesar  $3-5\mu\text{g}/\text{mL}$  dalam 1-2 jam setelah pemberian oral (Katzung, 2005). Isoniazid dimetabolisme melalui reaksi asetilasi di hati menjadi asetil isoniazid, yang kemudian mengalami hidrolisis menjadi asam isonikotinat dan monoasetilhidrazin. Isoniazid termasuk obat yang menginhibisi sitokrom P-450.

Penelitian sebelumnya menunjukan bahwa asupan makanan dapat mengurangi konsentrasi maksimal isoniazid dalam plasma darah hingga 40,2%. Asupan makanan juga meningkatkan Tmax dari isoniazid hingga 78,1% (Chun lin *et al*, 2014).

Komponen makanan dapat mempengaruhi konsentrasi obat dalam serum. Makanan yang tinggi lemak seperti yang direkomendasikan oleh FDA (Food and drug administration) akan mengurangi Cmax isoniazid hingga 32-51% dan AUC hingga 12-13% (Peloquin CA *et al*, 1999). Di lain studi pola makan karbohidrat dapat mengurangi Cmax dan AUC isoniazid ke tingkat yang lebih rendah daripada makanan yang tinggi lemak (Zent *et al*, 1995).

Metode analisis yang digunakan untuk mengetahui pengaruh makan pasien tuberkulosis terhadap kadar puncak isoniazid harus menggunakan metode yang akurat, tepat, teliti dan memiliki kepekaan yang tinggi. Kromatografi cair kinerja tinggi adalah teknik pemisahan dengan fase gerak yang berupa zat cair dialirkan dengan cepat dengan bantuan tekanan dan hasilnya dideteksi dengan instrumen. Analisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi bertujuan untuk mendapatkan pemisahan yang baik dalam waktu relatif cepat, daya pisahnya baik, kolom dapat dipakai kembali dan ideal untuk molekul besar dan ion (Johnson & Stevenson, 1991).

## **H. Hipotesis**

Berdasarkan landasan teori diatas dapat dikemukakan suatu hipotesis bahwa penggunaan isoniazid dalam kondisi sesudah makan dapat menurunkan kadar isoniazid dalam plasma darah pasien tuberkulosis.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah pasien tuberkulosis dengan pengobatan paket OAT tahap lanjut, sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasma darah pasien tuberkulosis dengan pengobatan OAT yang berisi isoniazid dan rifampisin.

##### **1. Kriteria inklusi**

- a. Diagnosa TB paru Non MDR
- b. Usia 17-60 tahun
- c. Suku jawa 3 generasi
- d. Mendapat pengobatan dengan paket OAT baik kategori 1, 2, atau 3
- e. Merupakan pasien rawat jalan
- f. Berat badan 40-60 kg

##### **2. Kriteria eksklusi**

Pasien dengan penyakit komplikasi

##### **3. Cara pengambilan sampel**

Sampel yang diperiksa dalam penelitian ini adalah plasma darah pasien tuberkulosis yang mendapat pengobatan antituberkulosis (OAT) yang mengandung isoniazid dan rifampisin di wilayah puskesmas dan Balai Pengobatan Paru yang terdapat di Kabupaten Bantul dan beberapa Rumah sakit di Bantul dan Yogyakarta. Pasien yang diambil darahnya adalah pasien yang telah menjalani pengobatan tuberkulosis tahap lanjut yang dibagi menjadi 2 kontrol yaitu sebelum dan sesudah makan. Pengambilan sampel langsung dilakukan di tempat yaitu puskesmas, setelah pasien meminum obat darah langsung diambil 2 jam setelah pasien mengkonsumsi obat tersebut. Sampel darah yang telah diambil

dimasukkan ke dalam vacutainer yang berisi EDTA, lalu disimpan dalam frezeer suhu -20°C sampai waktu analisis penentuan kadar dilakukan.

## **B. Variabel Penelitian**

### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah variasi pemberian obat TB sebelum dan sesudah makan. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah pengaruh aturan makan obat terhadap kadar isoniazid pada pasien tuberkulosis.

### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama, pola pemberian obat pasien tuberkulosis yang dibagi menjadi 2 perlakuan yaitu sebelum dan sesudah makan. Variabel utama kedua, pengaruh aturan makan obat terhadap kadar isoniazid pada pasien tuberkulosis yang diambil dari plasma darah. Pengaruh aturan makan obat terhadap kadar isoniazid dapat dilihat dari kadar obat dalam plasma dengan melihat luas puncak dari isoniazid. Variabel utama ketiga, kromatografi cair kinerja tinggi adalah KCKT Shimadzu untuk menentukan kadar isoniazid. Variabel utama keempat, sampel darah pasien tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut.

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

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi pemberian obat pasien tuberkulosis tahap lanjut.

Variabel tergantung yang dimaksud dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan penelitian, yaitu isoniazid dengan adanya pengaruh makanan yang mempengaruhi kadar isoniazid.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pasien tuberkulosis tahap lanjut, keahlian peneliti, kemurnian bahan pembanding, kondisi laboratorium.

Variabel tidak terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang tidak dapat dikendalikan oleh peneliti sehingga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Dalam hal ini darah, enzim-enzim tubuh pasien tuberkulosis dan makanan apapun yang dikonsumsi pasien.

### **3. Definisi oprasional variabel utama**

Pertama, variasi pemberian obat adalah pola pemberian obat isoniazid pada pasien tuberkulosis tahap lanjut yang diberikan sebelum makan atau sesudah makan. Pasien yang mengkonsumsi obat sebelum makan berada pada kondisi berpuasa dimana pasien tidak mengkonsumsi makanan ataupun minuman sama sekali sebelum mengkonsumsi obat. Makanan yang dikonsumsi pasien tidak diatur sama sekali, jadi pasien bebas mengkonsumsi makanan atau minuman apa saja.

Kedua, isoniazid adalah hidrazid dari asam isonikotinat yang merupakan suatu analog sintetik piridoksin. Isoniazid merupakan antibiotik dengan aktivitas bakterisid dan bakteriostatik terhadap mikobakterium. Isoniazid atau INH bekerja dengan menghambat sintesa asam mikolinat yang merupakan unsur penting pembentukan dinding sel mikobakterium tuberkulosis.

## **C. Alat dan bahan**

### **1. Alat**

Kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu), injektor manual, kolom C<sub>18</sub> (Shimpack<sup>®</sup> 5 µm: 250 × 4,6 mm), detektor UV (SPD-6A), dengan pengolah data

pada komputer, spektrofotometer UV-VIS (Jasco); syringe; timbangan analitik (Shimadzu); penyaring eluen (Whatman); penghilang gas (Elmasonic S60H); sentrifugator (spectrafuge); vortex (Maxi Max); mokroplet (Socorex); mikrotube; vacutainer; ice box, alat-alat glas.

## 2. Bahan

Isoniazid (Pharos), aqua bidestilata (Ika Pharmindo), asetonitril (For HPLC), kalium dihidrogen fosfat (For analysis, Merck), trietilamin, metanol (For analysis, Merck), plasma kontrol, sampel darah pasien tuberkulosis tahap lanjut.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Pembuatan larutan induk isoniazid

Senyawa baku isoniazid ditimbang dengan seksama sebanyak 7,5 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukuran 25,0 mL. Dilarutkan dengan air, kemudian ditambah sampai batas labu ukur, hingga diperoleh konsentrasi isoniazid 300 $\mu$ g/mL.

### 2. Penetapan panjang gelombang analisis

Dibuat larutan induk isoniazid diencerkan dengan air hingga diperoleh konsentrasi 10  $\mu$ g/mL. Larutan tersebut dibuat kurva serapnya dan dicatat nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis. Nilai panjang gelombang optimum dipilih untuk analisis.

### 3. Pembuatan fase gerak

Fase gerak larutan kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1). Campur 495 mL larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mmol pH 6,2 yang telah diatur dengan trietilamin (TEA) dengan 5 mL asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak dilakukan proses penghilangan gas.

### 4. Optimasi kondisi analisis

**4.1 Pemilihan fase gerak dan kecepatan aliran untuk analisis.** Larutan yang mengandung isoniazid dengan konsentrasi 10  $\mu$ g/mL disuntikkan sebanyak 20.0  $\mu$ L ke dalam alat KCKT dengan perbandingan fase gerak yang berbeda yaitu

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH6,2-ACN (99:1) dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH6,2-ACN (97:3) dengan laju alir yang digunakan 1,0 mL/menit. Catat dan bandingkan kedua fase gerak yang digunakan dengan melihat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh. 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. Fase gerak dan laju alir yang terpilih selanjutnya dibuat molaritas (5mmol, 10mmol dan 15mmol) yang berbeda beda. Dicatat dan dibandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh untuk melihat fase gerak yang paling baik dalam memisahkan senyawa.

Tabel 1. Pemilihan fase gerak untuk analisis

<b>Pemilihan fase gerak</b>	
<b>Perbandingan komposisi</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH6,2-ACN (99:1) Vs $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH6,2-ACN (97:3)
<b>Perbandingan Laju alir</b>	0,8 mL/menit; 1,0 mL/menit; 1,2 mL/menit
<b>Perbandingan Molaritas</b>	5 mmol; 10 mmol; 15 mmol

**4.2 Pengaruh rifampisin terhadap analisis.** Larutan rifampisin dengan konsentrasi 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) dan laju alir 1,0 mL/menit. Kemudian diamati apakah ada ganguan yang mengganggu terhadap waktu retensi isoniazid.

## 5. Preparasi sampel isoniazid di dalam plasma darah

Darah diambil dari donatur (dewasa dan sehat) sebanyak 5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam vakutainer yang berisi EDTA lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3600 rpm selama 15 menit. Plasma yang terbentuk diambil menggunakan pipet mikron dan dimasukkan dalam vakutainer kosong untuk selanjutnya dianalisis.

Larutan induk isoniazid dengan konsentrasi tertentu diencerkan dengan plasma darah di dalam labu ukur 2 mL hingga diperoleh konsentrasi isoniazid di dalam plasma menjadi 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Larutan plasma yang mengandung isoniazid dideproteinasi dengan cara : larutan plasma dipipet 500  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Larutan plasma tersebut ditambahkan asetonitril sebanyak 500  $\mu\text{l}$  sehingga diperoleh perbandingan plasma dan asetonitril menjadi 1:1 (v/v). Larutan plasma dan asetonitril divortex selama 30 detik kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, selama 5 menit. Supernata hasil sentrifugasi diambil menggunakan *syringe* dan dimasukkan dalam vial menggunakan *syringe filter*.

## 6. Validasi metode

**6.1 Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linieritas.** Larutan baku yang mengandung isoniazid konsentrasi 2; 3; 4; 5 dan 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  masing-masing sampel disuntikkan Sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ke alat KCKT pada kondisi terpilih, tiap konsentrasi direplikasi sebanyak 3 kali. Setelah itu buat perbandingan antara luas area (y) yang diperoleh terhadap konsentrasi isoniazid (x). Kemudian dihitung koefisien korelasi dari persamaan garis linier tersebut.

**6.2 Penentuan LOD dan LOQ.** Data area per konsentrasi yang diperoleh dari data kalibrasi digunakan untuk perhitungan LOD dan LOQ. Nilai LOD diperoleh melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus:  $LOD = \frac{3 Sb}{b}$ .

Sedangkan nilai LOQ dihitung melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus:  $LOQ = \frac{10 Sb}{b}$ .

**6.3 Uji selektivitas.** Larutan plasma yang mengandung isoniazid dengan konsentrasi tertentu dan larutan plasma yang tidak mengandung isoniazid dideproteinasi seperti pada preparasi sampel serta larutan isoniazid baku masing-masing sampel disuntikkan ke alat KCKT sebanyak 20  $\mu\text{L}$  pada kondisi terpilih. Diamati puncak hasil pengotor plasma pada waktu retensi tertentu dan dibandingkan dengan waktu retensi puncak isoniazid

**6.4 Uji akurasi dan perolehan kembali.** Larutan isoniazid dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan tinggi 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  masing-

masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Diulangi sebanyak tiga kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung nilai % *diff* dan nilai % perolehan kembali (% recovery) dengan rumus terlampir. Nilai % perolehan kembali disyaratkan berada pada rentang 70-102% (Harmita, 2004).

**6.5 Uji presisi.** Larutan baku isoniazid dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan tinggi 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sebanyak 20,00  $\mu\text{L}$  masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Diulangi sebanyak tiga kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung nilai RSD dengan rumus terlampir. Nilai RSD disyaratkan kurang dari 2% (Harmita, 2004).

## 7. Pemeriksaan kadar isoniazid dalam plasma darah pasien tuberkulosis

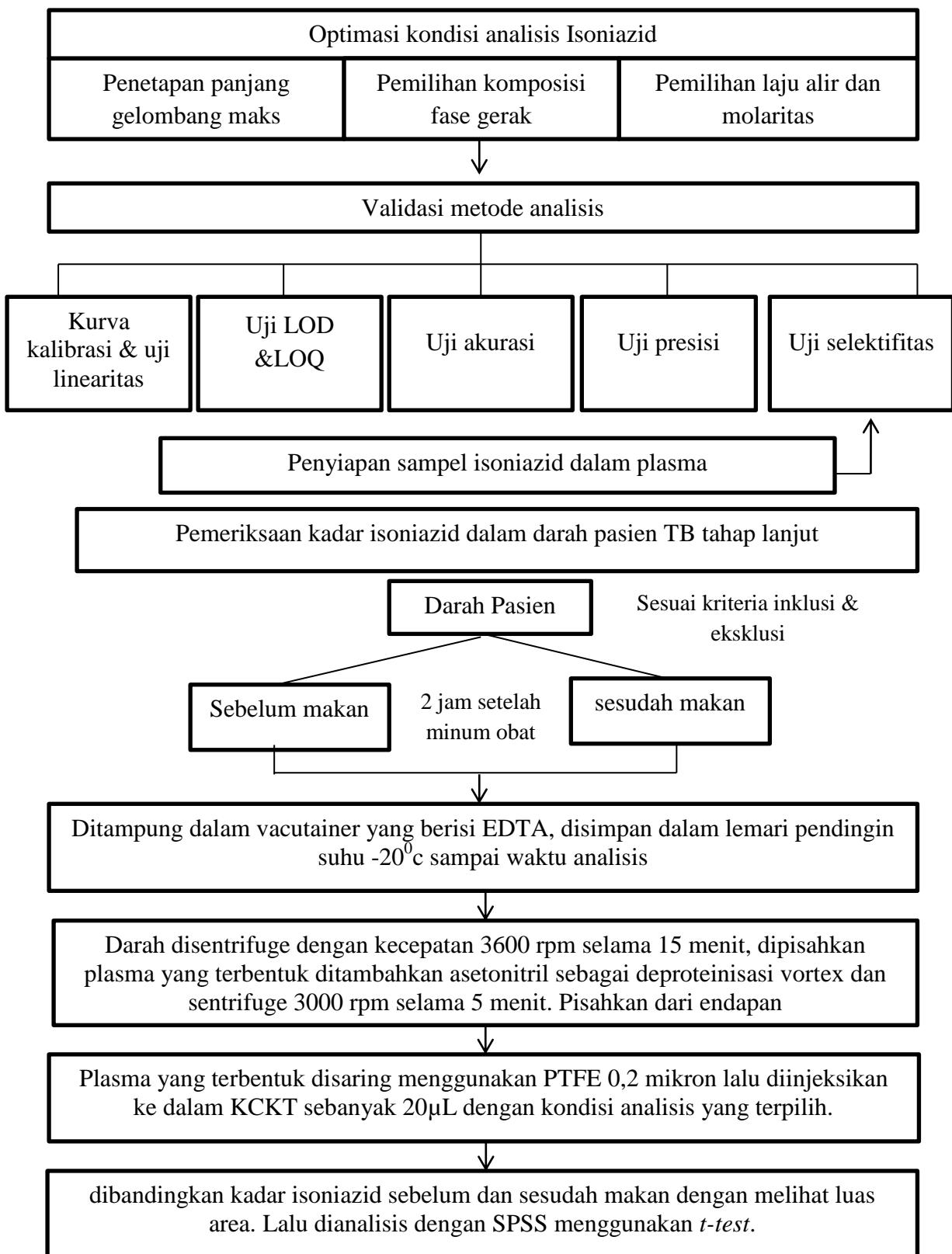
Sampel yang digunakan adalah darah pasien tuberkulosis tahap lanjut yang didapat di puskesmas dan balai pengobatan paru daerah bantul. Sampel terdiri dari 3 darah pasien tuberkulosis yang mengkonsumsi obat sebelum makan dan 3 darah pasien tuberkulosis yang mengkonsumsi obat setelah makan.

Sampel darah diambil 2 jam setelah pasien minum obat antituberkulosis. Sampel darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam vacutainer yang berisi EDTA, lalu disimpan dalam *freezer* suhu -20°C sampai waktu analisis dilakukan menggunakan KCKT. Darah yang telah disimpan disentrigugasi dengan kecepatan 3600 rpm selama 15 menit, dipisahkan plasma dari endapan. Plasma yang terbentuk selanjutnya dideproteinisasi dengan cara : larutan plasma dipipet 200  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Larutan plasma tersebut ditambahkan asetonitrill sebanyak 200  $\mu\text{l}$  sehingga diperoleh perbandingan plasma dan asetonitrill menjadi 1:1 (v/v). Larutan plasma dan asetonitrill divortex selama 30 detik kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil menggunakan *syringe* dan dimasukkan dalam vial menggunakan *syringe filter* yaitu PTFE 0,2 mikron.

Sampel yang telah disaring diinjekkan ke dalam KCKT dengan panjang gelombang, laju alir dan perbandingan fase gerak sesuai hasil optimasi sampel INH. Dilihat kromatogram yang terbentuk dan waktu retensinya. Dihitung kadar obat dalam plasma dengan menghitung luas area puncak.

## **E. Analisis Data**

Data dianalisis menggunakan SPSS versi 17. Analisis data menggunakan *t-test*, yaitu *paired samples t-test*.



**Gambar 3. Skema jalanya penelitian**

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Pemilihan panjang gelombang**

Pada penelitian ini, pemilihan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setiap zat aktif dibuat spektrum serapannya pada konsentrasi  $10\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemudian ditentukan panjang gelombang optimumnya. Panjang gelombang optimum terpilih adalah 230 nm. Pentingnya memilih panjang gelombang dimana diharapkan sensitivitas detektor terhadap isoniazid menjadi lebih besar sehingga memungkinkan untuk menganalisis isoniazid, terutama dalam matriks biologis, dengan konsentrasi yang minimum. Spektrum serapan pada spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada lampiran 4 Gambar 5.

#### **4.2 Optimasi kondisi analisis**

##### **4.2.1 Pemilihan fase gerak dan kecepatan alir**

Pada pemilihan fase gerak, analisis dilakukan dengan KCKT menggunakan kolom C18, dengan volume penyuntikan  $20\ \mu\text{L}$ . Sistem kromatografi yang digunakan adalah sistem isokratik dengan kombinasi fase gerak kalium dihidrogen fospat, asetonitril dan aquabides pada berbagai perbandingan.

Struktur molekul isoniazid disusun dari molekul-molekul yang bersifat polar. Untuk itu komposisi fase gerak yang dipakai untuk analisis isoniazid terdiri dari pelarut organik yaitu asetonitril agar diperoleh fase gerak yang memiliki kepolaran yang sama dengan isoniazid sehingga dapat membawa isoniazid dan memisahkannya dari pengotor dalam plasma.

Optimasi fase gerak bertujuan untuk mengetahui fase gerak yang terbaik untuk memisahkan senyawa-senyawa yang diuji. Dalam proses optimasi fase gerak pada HPLC, prinsip *like dissolved like* sangatlah menentukan. *Like dissolved like* secara sederhana dapat diartikan bahwa senyawa dengan tingkat polaritas yang sama dengan fase gerak akan saling tarik menarik, sedangkan

apabila tingkat polaritas berbeda maka akan saling tolak menolak. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah oktadesil silika (C-18). Oktadesil silika merupakan jenis fase diam yang paling umum digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa obat karena sifatnya yang nonpolar (Gandjar dan Rohman, 2007).

Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini merupakan campuran dua larutan yakni kalium dihidrogen fospat dan asetonitril dengan perbandingan yang berbeda. Perbedaan perbandingan inilah yang membedakan polaritas dari fase gerak. Fase gerak yang pertama terdiri dari kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (93:7) dan kedua terdiri dari kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) sampel isoniazid diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L dengan laju alir 1,0 mL/menit didapatkan bahwa fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) merupakan fase gerak yang terbaik untuk analisis isoniazid karena memberikan nilai plat teoritis (N) lebih besar dibanding fase gerak yang pertama analisis ini dapat dilihat pada lampiran 5 Tabel 5. Nilai plat teoritis menunjukkan kinerja kolom dalam memisahkan komponen dengan menggunakan metode tersebut. Semakin besar nilai plat teoritis berarti semakin efisien kolom dalam memisahkan komponen tersebut.

Optimasi metode analisis dilakukan dengan mengubah laju alir sistem kromatografi. Laju alir yang semula digunakan adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Data analisis dapat dilihat pada lampiran 5 Tabel 6. Laju alir yang dipilih adalah 1mL/menit karena dapat memberikan nilai N, HETP dan pemisahan yang baik.

Tahap selanjutnya mengubah molaritas fase gerak yang terpilih dari molaritas 10 mmol divariasikan menjadi 5 mmol, 10 mmol dan 15 mmol. Molaritas yang terpilih adalah 15 mmol karena dapat memberikan pemisahan yang paling baik terhadap senyawa isoniazid hasil analisis dapat dilihat pada lampiran 5 tabel 7.

Dari hasil optimasi ini, maka diperoleh suatu kondisi analisis isoniazid dengan ketentuan sebagai berikut :

- Spesifikasi alat : KCKT merk Shimadzu

- Kolom : ODS (150 × 4,6 )
- Fase gerak : kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril dengan perbandingan 99:1 dan molaritas 15 mmol
- Laju alir : 1 mL/menit
- Teknik : isokratik
- Panjang gelombang : 230 nm
- Volume injeksi : 20  $\mu$ l

#### 4.2.2 Pengaruh rifampisin terhadap analisis

Plasma yang digunakan adalah plasma darah pasien tuberkulosis tahap lanjutan yang mendapatkan pengobatan tablet kombinasi yang terdiri dari isoniazid 300 mg dan rifampisin 450 mg. Dengan adanya rifampisin yang juga dikonsumsi bersama isoniazid, maka perlu dilihat pengaruh adanya rifampisin terhadap kromatogram isoniazid. Dari hasil percobaan, rifampisin tidak mempengaruhi kromatogram pada rate time isoniazid. Artinya senyawa rifampisins tidak muncul pada saat analisis baik tunggal maupun campuran dengan isoniazid menggunakan pelarut dan fase gerak tersebut. Hal ini disebabkan karena rifampisin yang cenderung non polar sedangkan pelarut dan fase gerak yang digunakan adalah polar, sehingga tidak terelusi dengan fase gerak terpilih. Gambar dapat dilihat pada lampiran 11 Gambar 8.

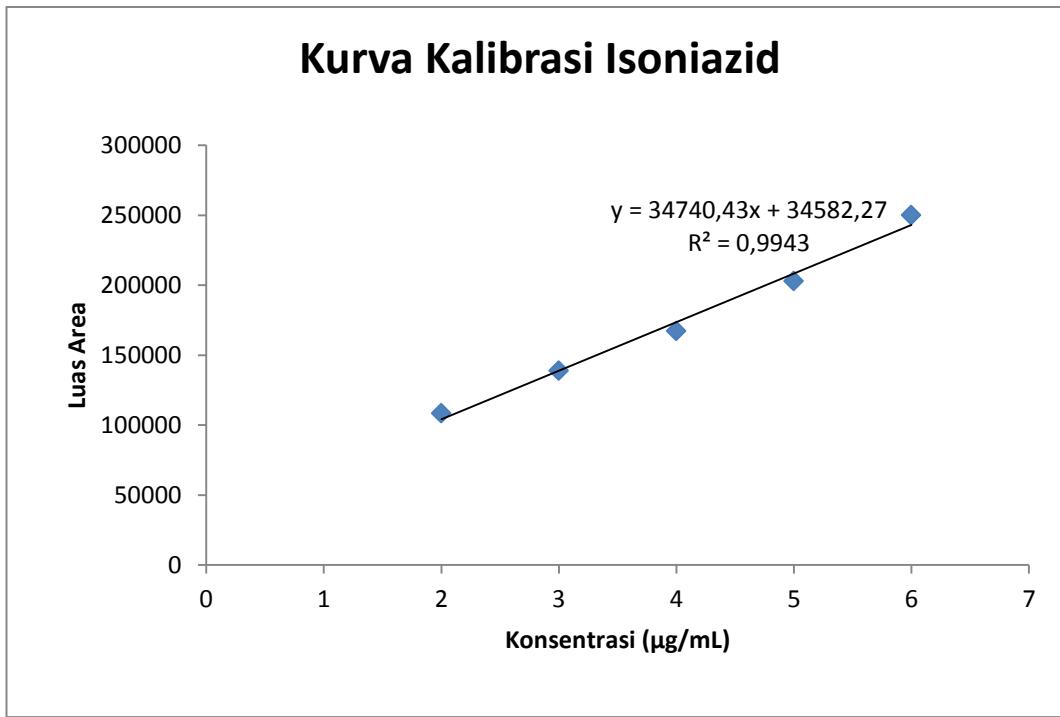
#### 4.3 Validasi Metode

##### 4.3.1 Kurva kalibrasi dan uji linearitas

Penentuan linieritas kurva kalibrasi isoniazid standar ditentukan berdasarkan luas area. Menurut Johnson & Stevenson (1991), penentuan kadar dapat dilakukan dengan mengukur luas puncak atau tinggi puncak maupun luasnya dapat dihubungkan dengan konsentrasi.

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon alat dengan konsentrasi analit yang diketahui. Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan dengan melihat respon KCKT terhadap isoniazid dengan konsentrasi 2  $\mu$ g/mL, 3  $\mu$ g/mL, 4  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL dan 6  $\mu$ g/mL. Persamaan regresi yang diperoleh adalah  $y =$

$34740,43x + 34582,27$  dengan nilai regresi ( $r$ ) 0,9888. Data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 6 tabel 8.



**Gambar 4. Kurva kalibrasi isoniazid**

#### 4.3.2 Penentuan LOD dan LOQ

Dengan menggunakan data kalibrasi diatas, kemudian dihitung nilai LOD dan nilai LOQ. LOD (*Limit of Detection*) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memberikan respon signifikan oleh instrumen analisisnya. LOQ (*Limit of Quantification*) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat dianalisis secara akurat dan presisi.

Nilai LOD yang diperoleh dari kurva kalibrasi didapatkan nilai 0,58  $\mu\text{g/mL}$  dan nilai LOQ yang diperoleh 1,94  $\mu\text{g/mL}$ . Dari pengukuran kurva baku didapatkan bahwa semua kadar telah memenuhi syarat kadar terkecil yang dianjurkan. Cara perhitungan nilai LOD dan LOQ tercantum pada lampiran 7 tabel 9.

#### 4.3.3 Uji selektifitas

Selektifitas suatu metode adalah kemampuan suatu metode untuk mengukur analit yang dituju secara spesifik dan tepat dengan adanya komponen-

komponen lain di dalam sampel (*Validation of Compodial Methods*, 2008 dalam susanti, 2012). Uji selektivitas dilakukan untuk mengukur kemampuan suatu metode analisis dalam membedakan dan menghitung secara kuantitatif analit dari keberadaan zat lain yang ada di dalam pembawanya, dalam hal ini adalah pengotor yang ada di dalam plasma darah. Uji selektivitas dilakukan dengan membandingkan kromatogram isoniazid dengan kromatogram plasma blangko. Perbandingan ini digunakan untuk melihat puncak pengotor plasma yang muncul pada waktu analisis. Puncak pengotor plasma muncul pada waktu retensi 1,025-4,139 menit. Puncak isoniazid muncul pada waktu retensi 5 -7. Hasil ini menunjukkan bahwa metode ini selektif dalam memisahkan isoniazid dari pengotor lain yang ada di dalam plasma. Gambar pemisahan isoniazid dapat dilihat pada lampiran 11 gambar 7, 9 dan 10.

#### **4.3.4 Uji akurasi dan perolehan kembali**

Akurasi adalah ukuran yang menyatakan derajat kedekatan rata-rata hasil analisis dengan hasil teoritis. Hasil teoritis adalah hasil yang sebenarnya atau hasil yang diharapkan menurut teori yang digunakan. Untuk analisis dalam matriks biologis, selisih hasil analisis dengan teoritis dipersyaratkan berada dalam rentang  $\pm 20\%$ , nilai ini dinyatakan sebagai  $\%diff$  (FDA, 2013).

Untuk mendokumentasikan akurasi, ICH merekomendasikan pengumpulan data sebanyak 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda ( 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Data harus dilaporkan sebagai presentasi perolehan kembali. Persyaratan perolehan kembali untuk sampel dengan konsentrasi 100ng/mL-10 $\mu$ g/mL adalah 80-110% (Huber, 2007) dan menurut jurnal lain menyatakan syarat nilai perolehan kembali adalah 75-125% (Anonim, 2016) .

Secara berurutan, untuk konsentrasi 1 $\mu$ g/mL, 4 $\mu$ g/mL dan 7 $\mu$ g/mL diperoleh nilai  $\% recovery$  sebesar 114%, 97,50%, 112,57%. Jika hasil yang diperoleh dibandingkan dengan persyaratan yang ditentukan menurut Huber (2007) maka dapat disimpulkan bahwa metode telah memenuhi persyaratan uji akurasi dan perolehan kembali. Hasil uji akurasi dan perolehan kembali dapat

dilihat pada lampiran 8 tabel 10 dan gambar kromatogram dapat dilihat pada lampiran 11 gambar no 12, 13 dan 14.

**Tabel 2. Hasil uji akurasi dan perolehan kembali**

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Area terukur</b>	<b>konsentrasi terukur (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>% Recovery</b>
<b>1</b>	74535,33	1,14	114,00
<b>4</b>	170186,67	3,91	97,75
<b>7</b>	308304	7,88	112,57

#### 4.3.5 Uji presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi menyatakan keterulangan, yakni jika analisis dilakukan berulang maka perbedaan hasil yang diperoleh tidak melebihi syarat uji presisi. Presisi dinyatakan sebagai SD (Standar Deviasi) dan RSD (simpangan baku relatif).

Pada penelitian ini pengujian presisi pada pengukuran keterulangan. Larutan standar konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$  dan 7  $\mu\text{g/mL}$  isoniazid diinjeksikan sebanyak tiga kali pada hari yang sama (*interday precision*) lalu dihitung %RSD dari hasil yang diperoleh. Berikut adalah hasil keterulangan pengujian isoniazid:

**Tabel 3. Hasil uji presisi**

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Area terukur</b>	<b>konsentrasi terukur (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>SD</b>	<b>RSD</b>
<b>1</b>	74535,33	1,14	0,03	2,63
<b>4</b>	170186,667	3,90	0,06	1,54
<b>7</b>	308304	7,88	0,04	0,51

Menurut AOAC, kriteria seksama diberikan jika memberikan nilai standar deviasi relatif yaitu 2-5% dan menurut rohman 2007 uji presisi dapat diterima jika nilai standar deviasinya memberikan nilai 1-2%.

Dari data diatas diperoleh nilai RSD untuk konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$  dan 7  $\mu\text{g/mL}$  kurang dari 5% makan dapat disimpulkan bahwa metode telah memenuhi persyaratan uji presisi. Data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 9 tabel 11 dan lampiran no 11 pada gambar 11, 12 dan 13.

#### 4.4 Pemeriksaan Kadar Isoniazid Dalam Plasma Darah Pasien Tb

Sampel darah TB yang diambil 2 jam setelah pasien minum obat dengan kontrol sebelum dan sesudah makan di baca kadarnya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan melihat luas area puncak isoniazid yang selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan  $y = 34740,43x + 34582,27$  dan didapatkan kadar isoniazid dalam plasma pasien tuberkulosis dengan perlakuan sebelum dan sesudah makan sebagai berikut :

**Tabel 4. Kadar sampel tuberkulosis**

Kadar INH Sebelum Makan	Kadar INH Sesudah Makan
14,43 $\mu\text{g/mL}$	3,64 $\mu\text{g/mL}$
15,72 $\mu\text{g/mL}$	4,83 $\mu\text{g/mL}$
16,19 $\mu\text{g/mL}$	6,81 $\mu\text{g/mL}$
<b>Purata kadar sebelum makan</b>	<b>Purata kadar sebelum makan</b>
<b>15,45<math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>5,09<math>\mu\text{g/mL}</math></b>

Dari hasil pembacaan kadar isoniazid terdapat perbedaan kadar sebelum dan sesudah makan dimana purata kadar sebelum makan adalah 15,45  $\mu\text{g/mL}$  dan purata kadar sesudah makan adalah 5,09  $\mu\text{g/mL}$ . Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 10 tabel no 12 dan lampiran 11 gambar no 14 dan 15.

Penelitian sebelumnya menunjukan bahwa asupan makanan dapat mengurangi konsentrasi maksimal isoniazid dalam plasma darah hingga 40,2%. Asupan makanan juga meningkatkan Tmax dari isoniazid hingga 78,1% (Chun lin *et al*, 2014). Komponen makanan juga dapat mempengaruhi konsentrasi obat dalam serum. Makanan yang tinggi lemak akan mengurangi Cmax isoniazid hingga 32-51% dan AUC hingga 12-13% (Peloquin CA *et al*, 1999). Di lain studi

pola makan karbohidrat dapat mengurangi Cmax dan AUC isoniazid ke tingkat yang lebih rendah daripada makanan yang tinggi lemak (Zent *et al*, 1995). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa pemberian obat isoniazid sesudah makan dapat mempengaruhi kadar obat dalam plasma. Dari hasil uji statistik didapatkan bahwa rata-rata kadar isoniazid dengan kontrol sebelum makan dan sesudah makan berbeda secara nyata dibuktikan dengan probabilitas  $<0,05$  maka  $H_0$  ditolak.

Menurut teori kadar puncak isoniazid dicapai dalam waktu 2 jam setelah pemberian oral adalah 3-5  $\mu\text{g/mL}$ , berdasarkan hal tersebut terjadi peningkatan kadar isoniazid di dalam plasma baik yang dikonsumsi sebelum makan dan sesudah makan. Kenaikan kadar isoniazid sebelum makan mencapai 3 kali lipat yaitu sekitar 309% sedangkan sesudah makan mencapai 101%. Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan pasien merupakan penderita tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut yang telah mengkonsumsi obat isoniazid selama berbulan-bulan yang dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi obat isoniazid didalam darah.

Isoniazid bekerja dengan menghambat sintesa asam mikolinat yang merupakan unsur penting pembentukan dinding sel mikobakterium tuberkulosis. Isoniazid di absorpsi dengan mudah secara per oral. Di hati isoniazid terutama mengalami asetilasi dan pada manusia kecepatan metabolisme isoniazid dipengaruhi oleh faktor genetik yang secara bermakna mempengaruhi kadar obat dalam plasma dan masa paruhnya. Absorpsi isoniazid akan terganggu jika diminum bersamaan dengan makanan, terutam karbohidrat atau antasida yang mengandung aluminium.

Absorpsi atau penyerapan zat aktif adalah masuknya molekul-molekul obat ke dalam tubuh menuju ke peredaran darah tubuh setelah melewati sawar biologik (Aiache, *et al.*, 1993). Absorpsi obat adalah peran yang terpenting untuk akhirnya menentukan efektifitas obat (Joenoes, 2002). Sebelum obat diabsorpsi, terlebih dahulu obat itu larut dalam cairan biologis. Kelarutan serta cepat-lambatnya melarut menentukan banyaknya obat terabsorpsi. Dalam hal pemberian obat per oral, cairan biologis utama adalah cairan gastrointestinal.

Asupan makanan akan mengganggu absorpsi isoniazid didalam saluran cerna, isoniazid memerlukan kondisi asam untuk molarut zat-zat aktifnya sedangkan dengan adanya makanan akan meneikkan pH salauran cerna dan menunda atau memperlambat waktu pengosongan lambung sehingga penyerapan lebih lanjut sepanjang usus juga tertunda, tapi penurunan penyerapan tidak dipahami. Sehingga kelarutan isoniazid akan berubah yang berdampak pada absorpsi isoniazid. Jika absorpsi isoniazid terganggu maka akan menurunkan bioavailabilitas isoniazid. Dimana bioavailabilitas atau ketersediaan hayati menunjukkan suatu pengukuran laju dan jumlah bahan aktif atau bagian aktif yang diabsorpsi dari suatu produk obat dan tersedia pada target aksinya.

Perbedaan kadar yang terjadi antara kadar isoniazid yang dikonsumsi sebelum makan dan sesudah makan juga dapat disebabkan karena sampel yang diperiksa merupakan sampel dari individu yang berbeda. Tidak adanya kontrol yang dilakukan pada setiap pasien, sehingga tidak diketahui apa saja yang dikonsumsi pasien setelah mengkonsumsi obat atau sebelum menkonsumsi obat. Serta kondisi biologis antar individu yang berbeda dapat menyebabkan perbedaan kadar isoniazid dalam plasma.

Selain itu kondisi analisis memegang peranan penting dalam pembacaan kadar sampel biologis, itu sebabnya perlu dilakukan optimasi validasi kondisi analisis untuk mendapatkan kondisi yang sesuai untuk analisis isoniazid dalam sampel biologi. Pada saat dilakukan optimasi validasi kondisi analisis didapatkan beberapa kemungkinan yang menyebabkan perbedaan kadar isoniazid, diantaranya pada waktu penimbangan baku standar dan pengukuran baku standar untuk memperoleh persamaan regresi linear yang akan digunakan untuk pembacaan kadar dengan KCKT yang dilakukan oleh individu yang berbeda. Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi serta memiliki sensitifitas yang sangat tinggi sehingga jika terjadi perbedaan pengukuran akan mempengaruhi hasil analisis.

Stabilitas alat yang digunakan juga sangat mempengaruhi hasil analisis isoniazid dalam sampel biologis, tekanan yang tidak konstan serta kondisi alat yang sudah tua dapat menyebabkan perbedaan kadar yang satu dengan yang lain.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar isoniazid pada plasma darah pasien tuberkulosis dengan kontrol sebelum makan dan sesudah makan. Dimana kadar isoniazid sebelum makan adalah 15,45  $\mu\text{g/mL}$  dan kadar sesudah makan adalah 5,09  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **B. Saran**

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk:

1. Menggunakan pengendap protein lain, seperti asam trikloroasetat, asam perkolat, maupun kombinasi asam-asam tersebut dengan pelarut organik sehingga diharapkan hasil ekstraksi protein dari plasma menjadi lebih sempurna. Bila memungkinkan pula dapat dilakukan ekstraksi protein.
2. Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut tentang profil farmakokinetik yang lebih lengkap
3. Perlunya dilakukan validasi metode secara *in vivo*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ana Requena-Méndez, Geraint Davies et al., 2014. *Effects of Dosage, Comorbidities, and Food on Isoniazid Pharmacokinetics in Peruvian Tuberculosis Patients*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy
- Chambers. 2001. *Basic and Clinical Pharmacology*. 8th ed. Lange Medical Books-McGraw-Hill, New York. pp 803-13
- Chun Lin, Chih Yu et al., 2014. *Impact of food intake on the pharmacokinetics of first-line antituberculosis drugs in Taiwanese tuberculosis patients*. Elsevier Taiwan LLC & Formosan Medical Association
- Depkes. 2014. *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Donatus. 1994. *Parasetamol Kinetika Absorbsi dan Eliminasi Pada Tikus Jantan dalam Keadaan Defisiensi Vitamin E*, Tesis. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Evans, G. 2004. *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. USA: CRC Press.
- Fentimalia. 2010. *Pemeriksaan Kadar Isoniazid Dalam Plasma Darah Pasien TB Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Medan : Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for industry: Bioanalytical method validation*. 1-20. 23 Desember 2010.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Gritter, R.J, Bobbit, J.M, dan Schwarting, A.e. (1985). *Introduction of Chromatography*. Penerjemah: K. Padmawinata. *Pengantar Kromatografi*. Edisi III. Bandung: Penerbit ITB. Hal 186.
- Harkness Richard, diterjemahkan oleh Goeswin Agoes dan Mathilda B.Widianto.(1989.). *Interaksi obat*. Bandung: Penerbit ITB.
- Harmita, (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Hayes, Eveleyn et al., 1996, *Farmakologi Pendekatan Proses Keperawatan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.

- Hendayana S. 2006. *Kimia Pemisahan Kekerapan dan lama praperlakuan kurkuminoid dengan toksisitas akut dan kinerja toksikokinetika terhadap teofilin pada tikus*. Laporan Penelitian DPP/SPP Fak. Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Herchline, Thomas and Judith KA. 2007. *Tuberculosis : Article*. Emedicine. Section 2.
- Istiantoro, Y, H, dan setiabudy, 2007, *Farmakologi dan Tearpi, Edisi 5*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta
- Joenoes, Z.N. 1998. *Ars Prescrebendi*. Surabaya: Airlangga University Press
- Johnson, E.L., dan Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung: Penerbit ITB. Hal. 236.
- Katzung, Bertram G. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi VIII. Buku 3*. Salemba Medika, Jakarta. Hal 93-98.
- Mulja, M., Suhaman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Muttschler, Ernest, 1999. *Dinamika Obat : Farmakologi dan Toksikologi*. Penerbit ITB: Bandung.
- Putra, E.D.L. (2007). *Dasar-Dasar Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Hal. 43, 82-88
- Peloquin,C.A. (2008). *Tuberculosis. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach (7th Edition)*. USA:McGraw-Hill.
- Peloquin CA, Namdar R, Dodge AA, Nix DE. *Pharmacokinetics of isoniazid under fasting conditions, with food, and with antacids*. Int J Tuberc Lung Dis 1999;3:703e10.
- Riansyah AP, (2012). *Aktifitas Tablet Kunyah Kombinasi Ekstrak Daun Pepaya (Carica papaya, Linn.) Dan Buah Mengkudu (Morinda Citrifolia L.) Terhadap Parameter Kadar AST dan ALT Serum Tikus Galur Wistar Yang Diinduksi Isoniazid dan Rifampisin*. Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
- Rodrigues, A.D., 2002. *Drug-Drug Interaction, Vol 116*, 633-634, Marcel Dekker Inc., New York.

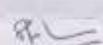
- Stella. 2011. *Optimasi dan Validasi Metode Analisis Isoniazid dan Pirazinamid Dalam Tablet 4 Fixed Dose Combination (4FDC) dan Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Depok : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departeman Farmasi Universitas Indonesia.
- Sudoyo, Aru W., Bambang S, Idrus A, Marcellus S, Siti S. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Edisi IV. Jilid I*. Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
- Tjay, T.H., dan Rahardja, K. (2002). *Obat-obat Penting*. Edisi Kelima. Cetakan Kedua. Jakarta: Penerbit PT. Elex Media Komputindo. Hal. 145-150.
- Wolff, M. E(1982). *Burger's Medical Chemistry: Therapeutic Agents*. Wiley' Interscience Publication.
- Zent C, Smith P. *Study of the effect of concomitant food on the bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide*. Tuber Lung Dis 1995.

# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Sertifikat analisis isoniazid

 <b>SERTIFIKAT ANALISIS</b> No.: 032/QC/WS/V/16			
Nama bahan No. kontrol Tanggal pelaksanaan Retest Penyimpanan Reference standard	: ISONIAZID, Working Standard : 16032F13 : 18 Mei 2016 : Mei 2017 : Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya, suhu 25°C (suhu yang penyimpanan yang diperbolehkan 15 – 30°C ) : USP Isoniazide RS, Lot IDG205		
Parameter Pengujian	Satuan	Hasil	Persyaratan
Pemerian	-	Sesuai	Serbuk habiur 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



Fitria Hini, SSI, Apt.  
 Pt. Manager 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, Okarwang Barat, 17530, Jawa Barat, PO Box 4111/KT 10041, Indonesia  
 Phone : (021) 88323971, 88323975  
 Fax : (021) 88323872/73  
 http : www.indofarma.co.id

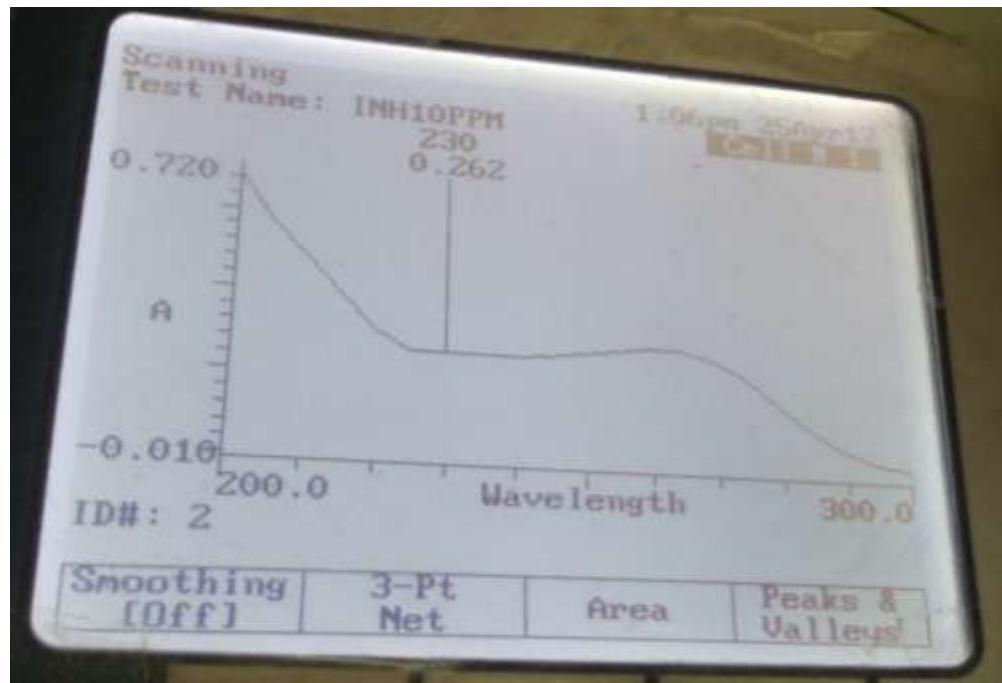
## Lampiran 2. analisis rifampisin

SERTIFIKAT ANALISIS			
No. 066/QC/WS/VIII/16			
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	%	0.12 0.12 0.20	Maks. 1.5 Maks. 1.0 Maks. 3.5
Kadar (dihitung terhadap zat kering, KCKT)	%	99.87	95.0 – 103.0 -
Kesimpulan : memenuhi syarat sesuai USP 37			
<p>Bekasi, 26 Agustus 2016</p> <p><i>Fitra Hini, S.Si, Apt.</i> Fitra Hini, S.Si, Apt. Plt. Manager Pengawasan Mutu</p> <p>PT INDOFARMA, Tbk. Commercial Office : Jl. Tambaran No. 2, Manggarai, Jakarta 13150 Phone : (021) 88323971, 88323975 Fax : (021) 88323972/73 http : www.indofarma.co.id</p>			

## Lampiran 3. Surat persetujuan komisi etik



Lampiran 4. Penentuan panjang gelombang isoniazid



Gambar 5. Panjang gelombang isoniazid

Lampiran 5. Optimasi fase gerak

**Tabel 5. Data hasil pemilihan fase gerak untuk isoniazid**

Fase gerak	Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (93:7)	Kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1)
<b>Plat teoritis (N)</b>	15430,81	18411,25
<i>Height Equivalent</i>		
<i>to a Theoretical Plate (HETP)</i>	0,000972	0,000814
<b>Faktor ikutan (Tf)</b>	1,640667	2,013667

**Tabel 6. Data hasil pemilihan laju alir**

Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)
<b>0,8</b>	8,787
<b>1,0</b>	7,026
<b>1,2</b>	5,875

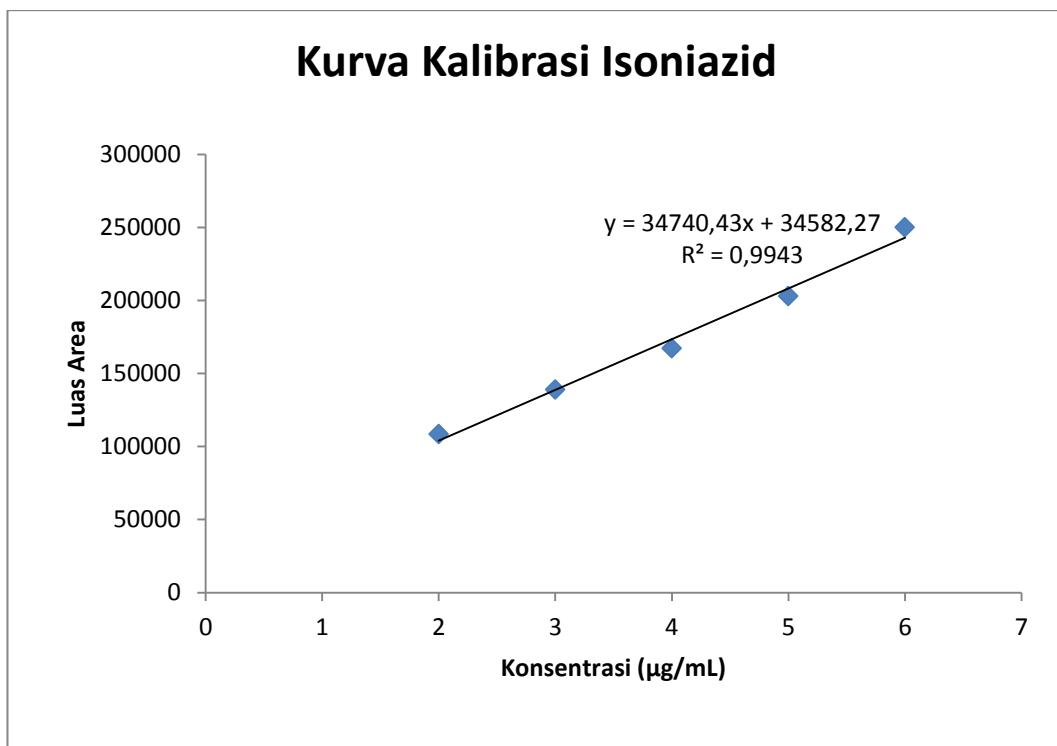
**Tabel 7. Data hasil pemilihan molaritas**

molaritas	5 mmol	10 mmol	15 mmol
<b>N</b>	27436,97	27172,22	28803,91
<b>HETP</b>	0,000546	0,000552	0,000525
<b>Tf</b>	3,23833	3,432	3,179

Lampiran 6. Kurva kalibrasi dan uji lleritas

**Tabel 8. Data kurva baku isoniazid**

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas puncak
2	108434,6667
3	138904,3
4	167309,7
5	202964,7
6	250106,7



**Gambar 6. Kurva kalibrasi isoniazid**

## Lampiran 7. Perhitungan LOD dan LOQ

**Tabel 9. Data hasil uji batas deteksi dan batas kuantitas**

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas area (y)	Luas area berdasarkan persamaan regresi linear (y')	(y-y')	$(y-y')^2$
2	108434,7	104063,13	4371,53	19110306,02
3	138904,3	138803,56	100,77	10155,20
4	167309,7	173543,99	-6234,29	38866371,80
5	202964,7	208284,42	-5319,72	28299420,88
6	250106,7	243024,85	7081,85	50152599,42
$\Sigma(y-y')^2$				<b>136438853,32</b>

Persamaan regresi linear

$$Y = a + bx$$

$$Y = 34582,27 + 34740,43 X$$

$$Sb = \sqrt{\frac{\sum(y - y')^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{136438853,32}{5 - 2}} = 6743,85771$$

$$LOD = \frac{3,3 Sb}{b} = \frac{3 \times 6743,85771}{34740,43} = 0,58$$

$$LOQ = \frac{10 Sb}{b} = \frac{10 \times 6743,85771}{34740,43} = 1,94$$

**Perhitungan y' :**

$$2 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$y = 34582,27 + 34740,43 X$$

$$y = 34582,27 + 34740,43 \times 2$$

$$y = 104063,13$$

3 µg/mL

$$y = 34582,27 + 34740,43 X$$

$$y = 34582,27 + 34740,43 \times 3$$

$$y = 138803,56$$

4 µg/mL

$$y = 34582,27 + 34740,43 X$$

$$y = 34582,27 + 34740,43 \times 4$$

$$y = 173543,99$$

5 µg/mL

$$y = 34582,27 + 34740,43 X$$

$$y = 34582,27 + 34740,43 \times 5$$

$$y = 208284,42$$

6 µg/mL

$$y = 34582,27 + 34740,43 X$$

$$y = 34582,27 + 34740,43 \times 6$$

$$y = 243024,85$$

Lampiran 8. Data hasil uji akurasi dan perolehan kembali

**Tabel 10. Data hasil uji akurasi dan perolehan kembali**

Konsentrasi Sebenarnya	Area terukur	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recovery
<b>1 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	75071	1,17	117,00
	74327	1,11	111,00
	74208	1,14	114,00
<b>4 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	169308	3,88	97,00
	168551	3,86	96,50
	172701	3,98	99,50
<b>7 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	306447	7,83	111,86
	309699	7,91	113,00
	308766	7,89	112,71

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Kadar terukur}}{\text{Kadar sebenarnya}} \times 100\%$$

**Perhitungan konsentrasi terukur :**

1  $\mu\text{g/mL}$

- 75071

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$75071 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{75071 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 1,165 \mu\text{g/mL}$$

- 74327

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$74327 = 31571,857 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{74327 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 1,144 \mu\text{g/mL}$$

- 74208

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$74208 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{74208 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 1,140 \mu g/mL$$

4 $\mu$ g/mL

- 169308

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$169308 = 334582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{169308 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 3,878 \mu g/mL$$

- 168551

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$168551 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{168551 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 3,856 \mu g/mL$$

- 172701

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$172701 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{172701 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 3,975 \mu g/mL$$

7 $\mu$ g/mL

- 306447

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$306447 = 34582,277 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{306447 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 7,825 \mu g/mL$$

- 309699

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$309699 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{309699 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 7,919 \mu\text{g/mL}$$

- 308766

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$308766 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{308766 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 7,892 \mu\text{g/mL}$$

**Perhitungan rata-rata % recovery untuk masing-masing konsentrasi :**

1μg/mL

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{1,14}{1} \times 100\% \\ &= 114,00\% \end{aligned}$$

4μg/mL

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{3,91}{4} \times 100\% \\ &= 97,75\% \end{aligned}$$

7μg/mL

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{7,86}{7} \times 100\% \\ &= 112,57\% \end{aligned}$$

Lampiran 9. Data hasil uji presisi

**Tabel 11. Data hasil uji presisi**

Konsentrasi Sebenarnya	Area terukur	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	RSD
	75071	1,17			
<b>1 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	74327	1,11	1,14	0,03	2,63
	74208	1,14			
	169308	3,88			
<b>4 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	168551	3,86	3,91	0,06	1,54
	172701	3,98			
	306447	7,83			
<b>7 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	309699	7,91	7,88	0,04	0,51
	308766	7,89			

Rata-rata :

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

Simpangan deviasi :

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

Koefisien variasi :

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

Lampiran 10. Perhitungan kadar sampel tuberkulosis

**Tabel 12. Kadar isoniazid dalam plasma pasien tuberkulosis**

<b>Perlakuan</b>	<b>Luas area pada kromatogram</b>	<b>Kadar isoniazid terukur (µg/mL)</b>
<b>Sebelum makan</b>	535974	14,43
	580372	15,72
	597136	16,19
<b>Sesudah makan</b>	160864	3,64
	202412	4,83
	271104	6,81

Perhitungan :

Sebelum makan

- 535974

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$535974 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{535974 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 14,43 \mu g/mL$$

- 580372

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$580372 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{580372 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 15,72 \mu g/mL$$

- 597136

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$597136 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{597136 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 16,19 \mu g/mL$$

Sesudah makan

- 160864

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$160864 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{160864 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 3,64 \mu g/mL$$

- 202412

$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$202412 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{202412 - 34582,27}{34740,43}$$

$$x = 4,83 \mu g/mL$$

- 104724

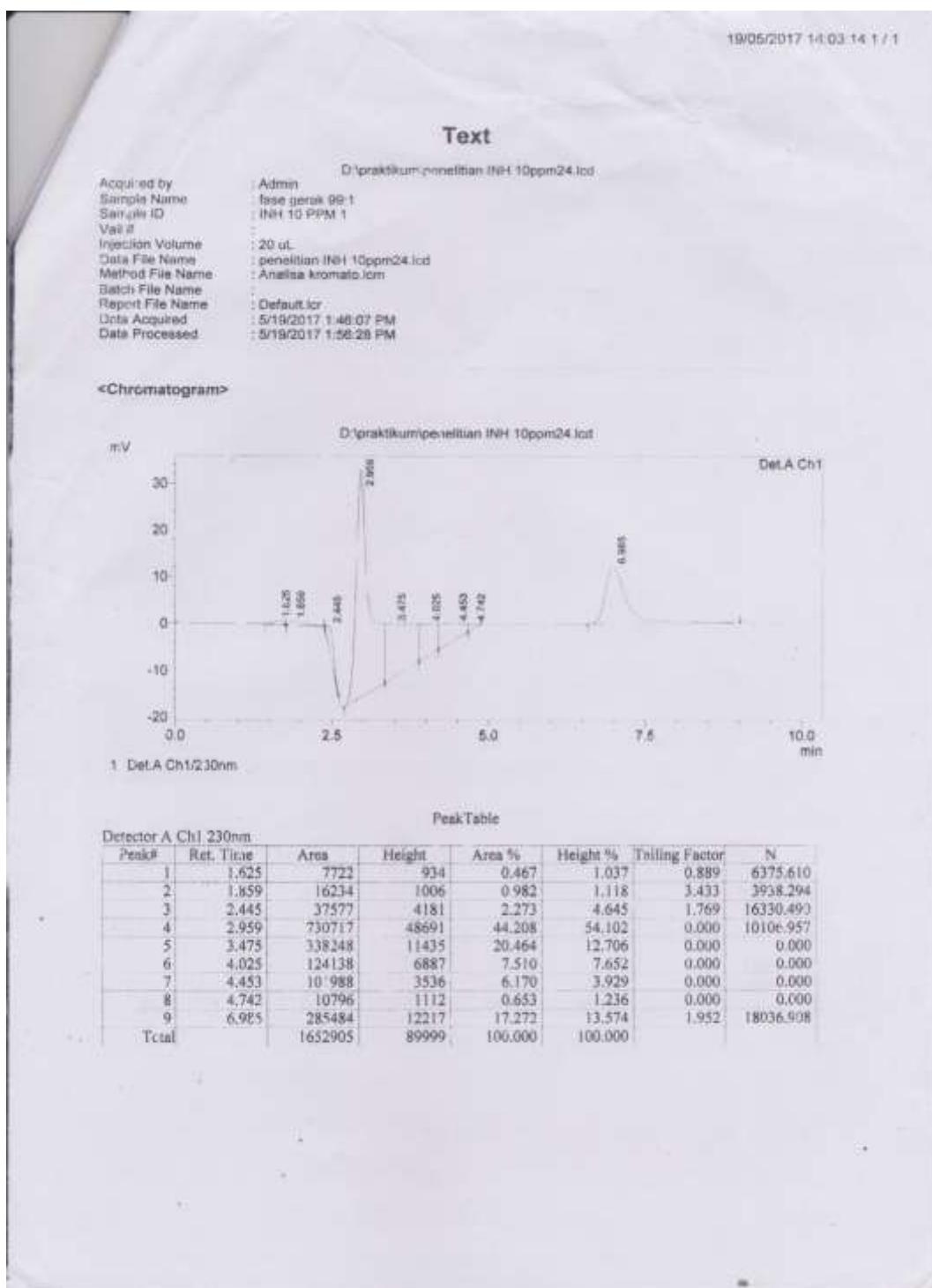
$$y = 34582,27 + 34740,43 x$$

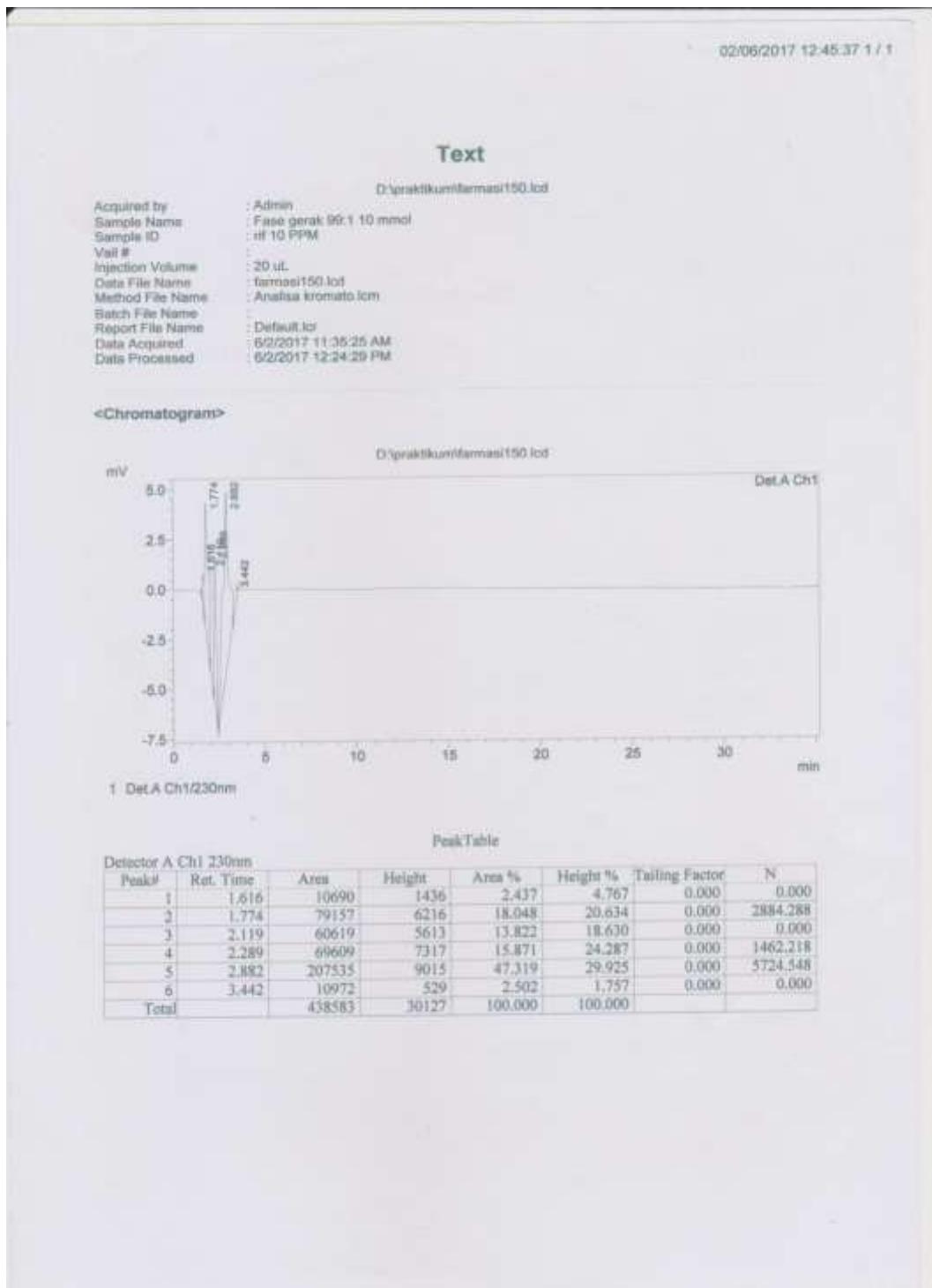
$$104724 = 34582,27 + 34740,43 x$$

$$x = \frac{104724 - 34582,27}{34740,43}$$

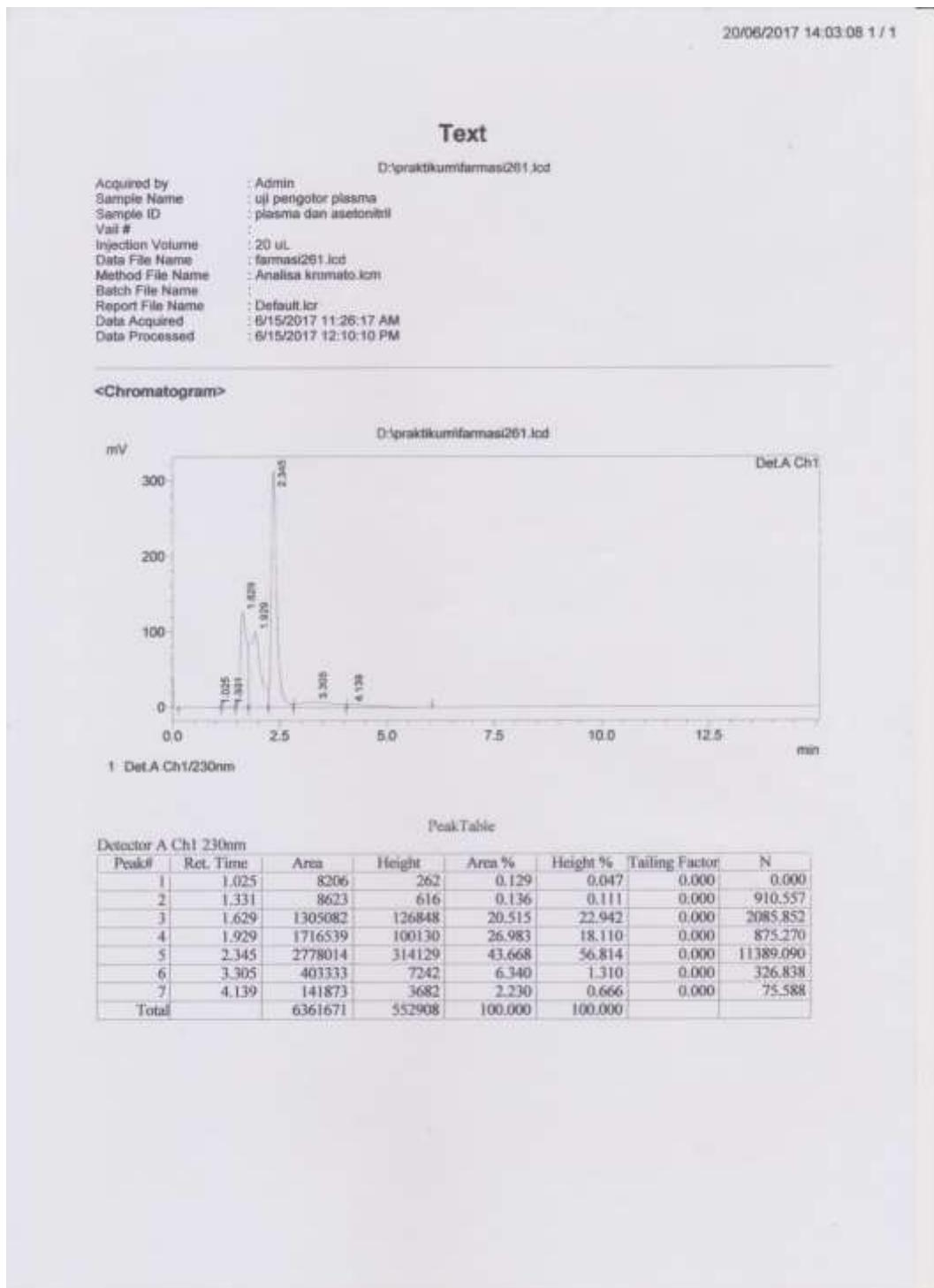
$$x = 6,81 \mu g/mL$$

## Lampiran 11. Gambar kromatogram

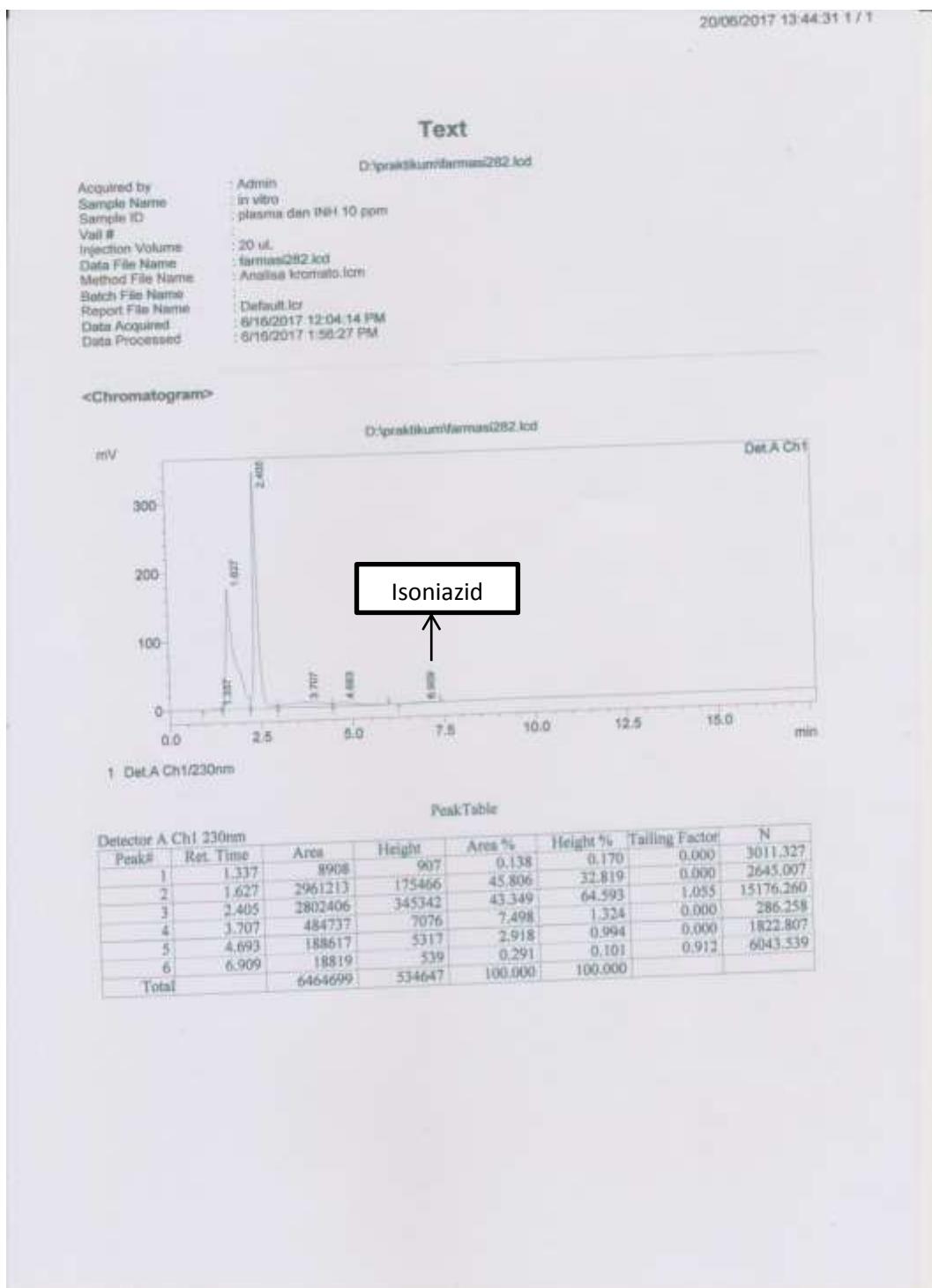
**Gambar. 7. Kromatogram larutan standar isoniazid**



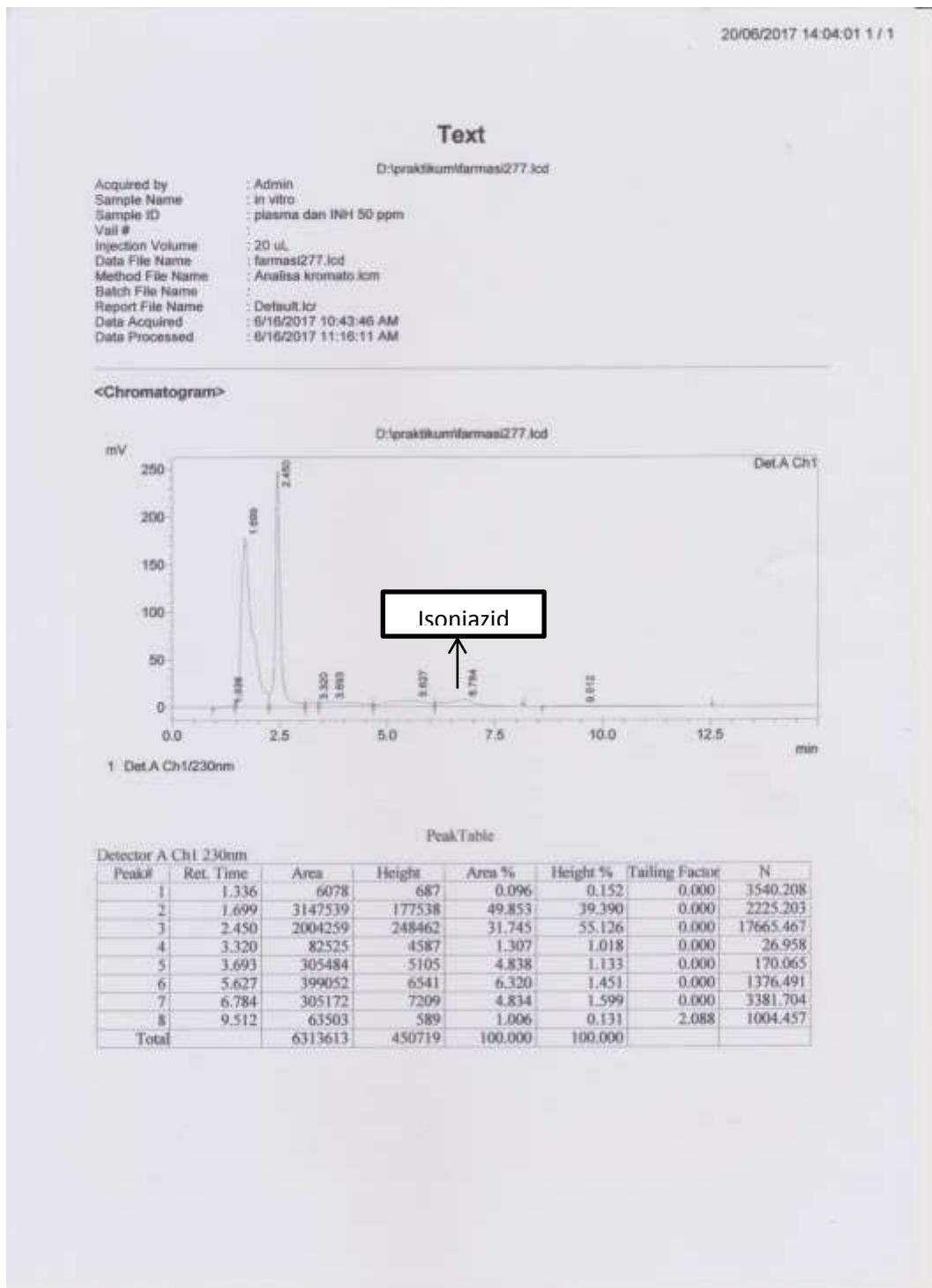
**Gambar 8. Kromatogram larutan standar rifampisin**



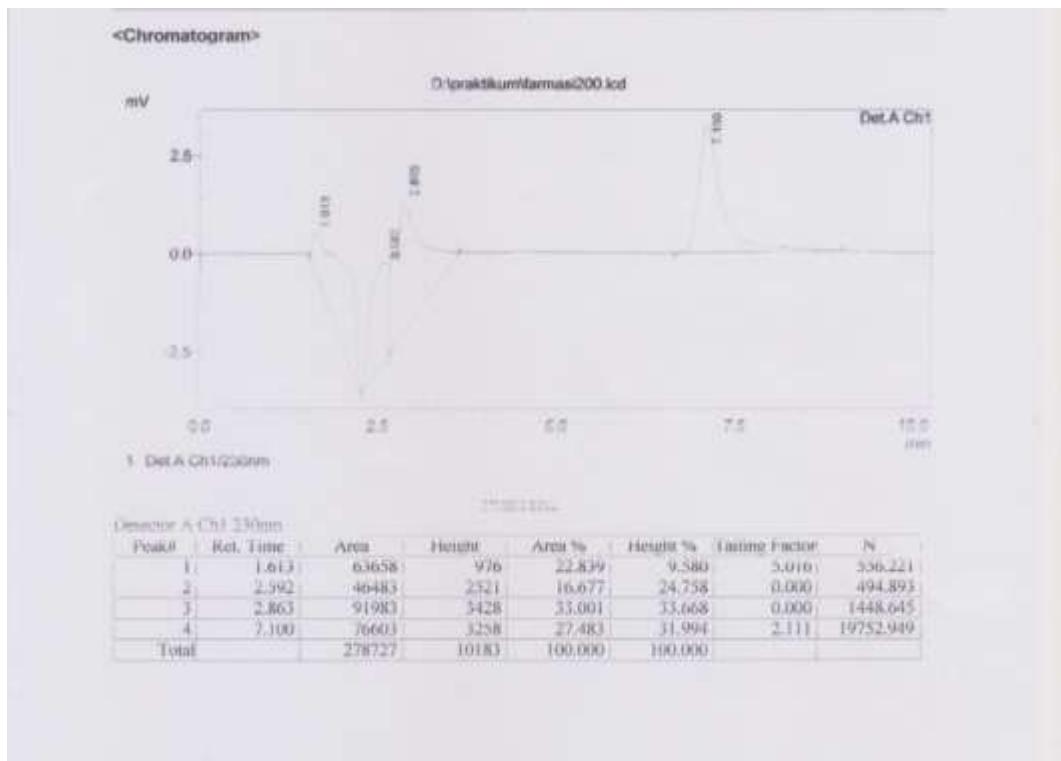
**Gambar 9. Kromatogram plasma kosong**



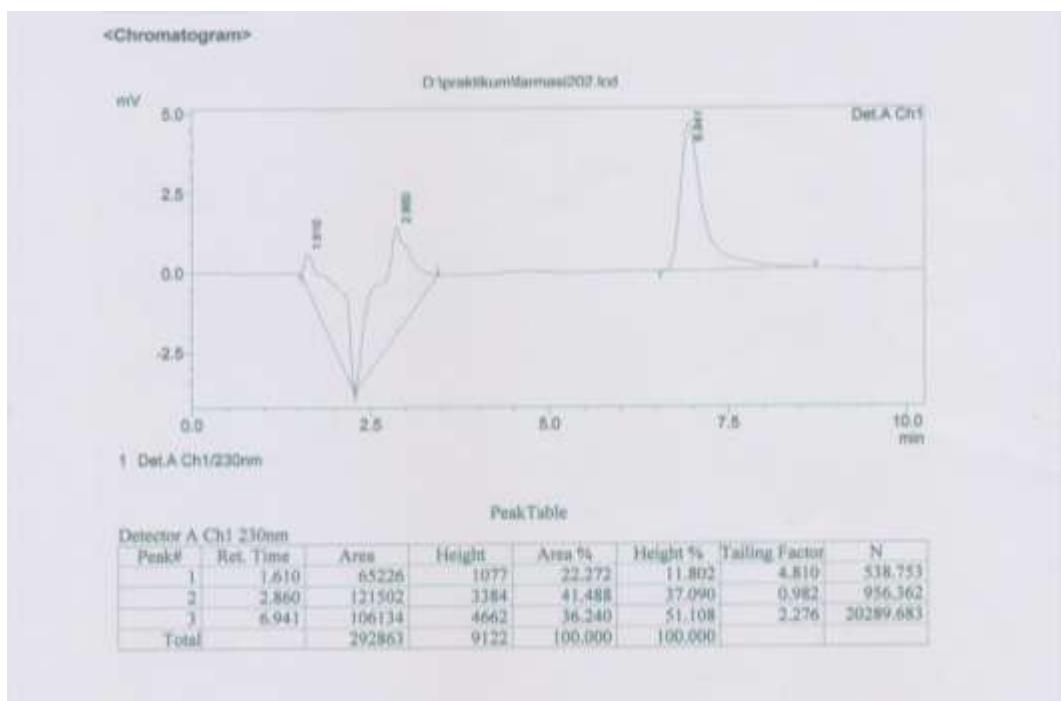
**Gambar 10. Kromatogram plasma dengan penambahan isoniazid dengan konsentrasi 10  $\mu$ g/mL**



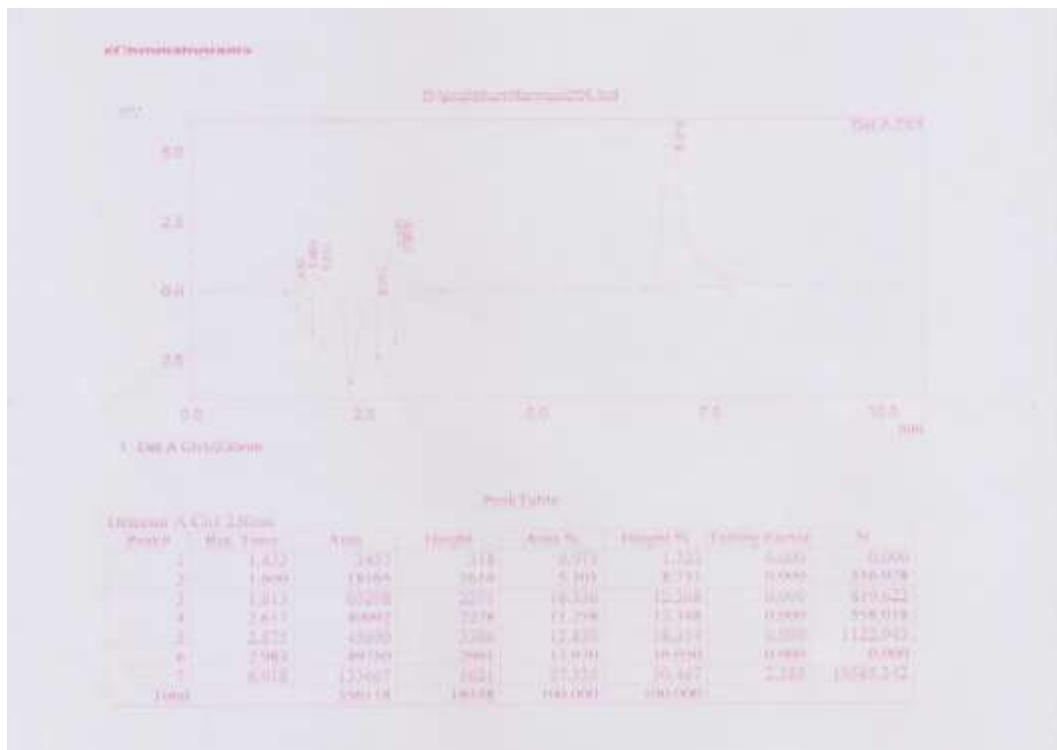
**Gambar 11. Kromatogram plasma dengan penambahan isoniazid dengan konsentrasi 50 µg/mL**



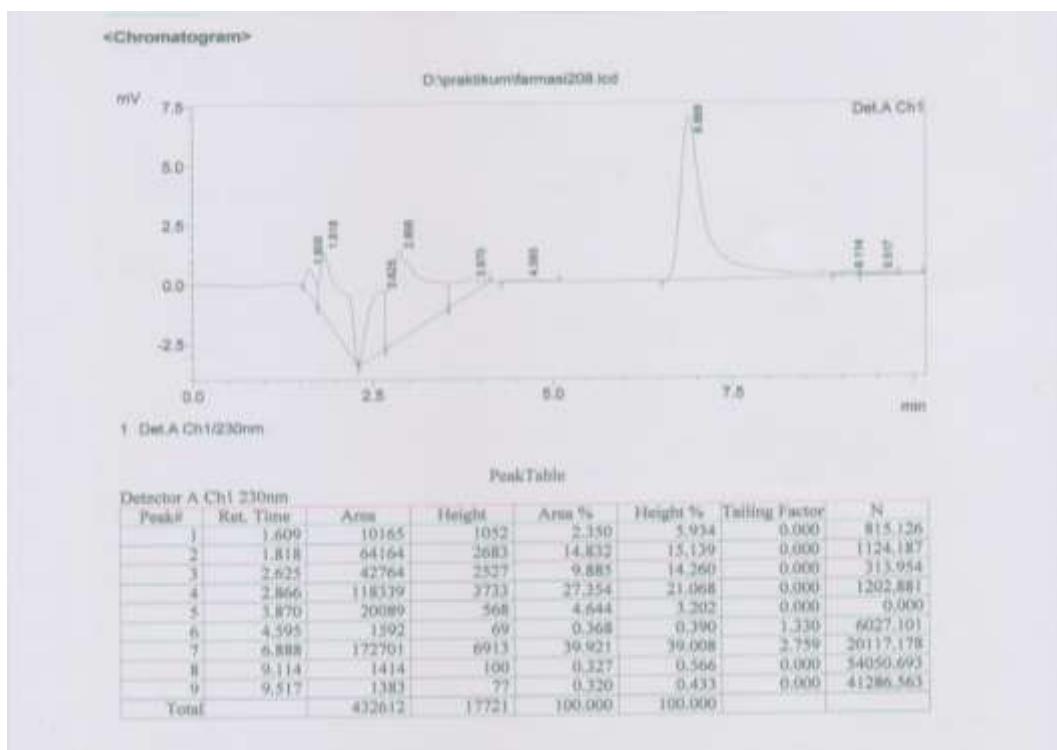
Gambar 12. Kromatogram kurva kalibrasi 1  $\mu\text{g/mL}$



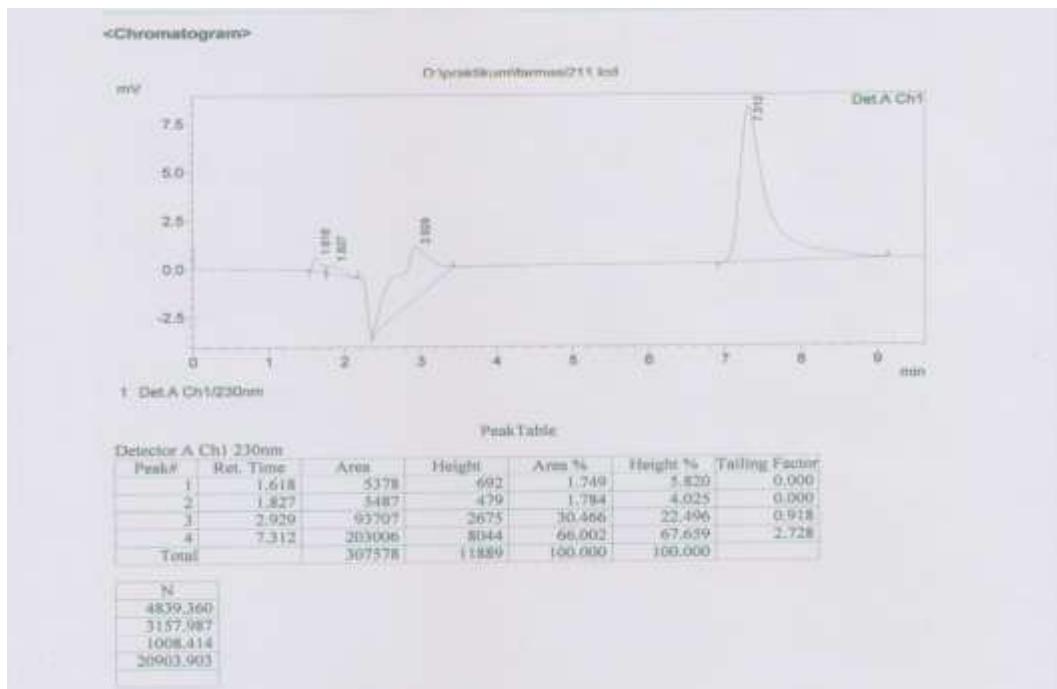
Gambar 13. Kromatogram kurva kalibrasi 2  $\mu\text{g/mL}$



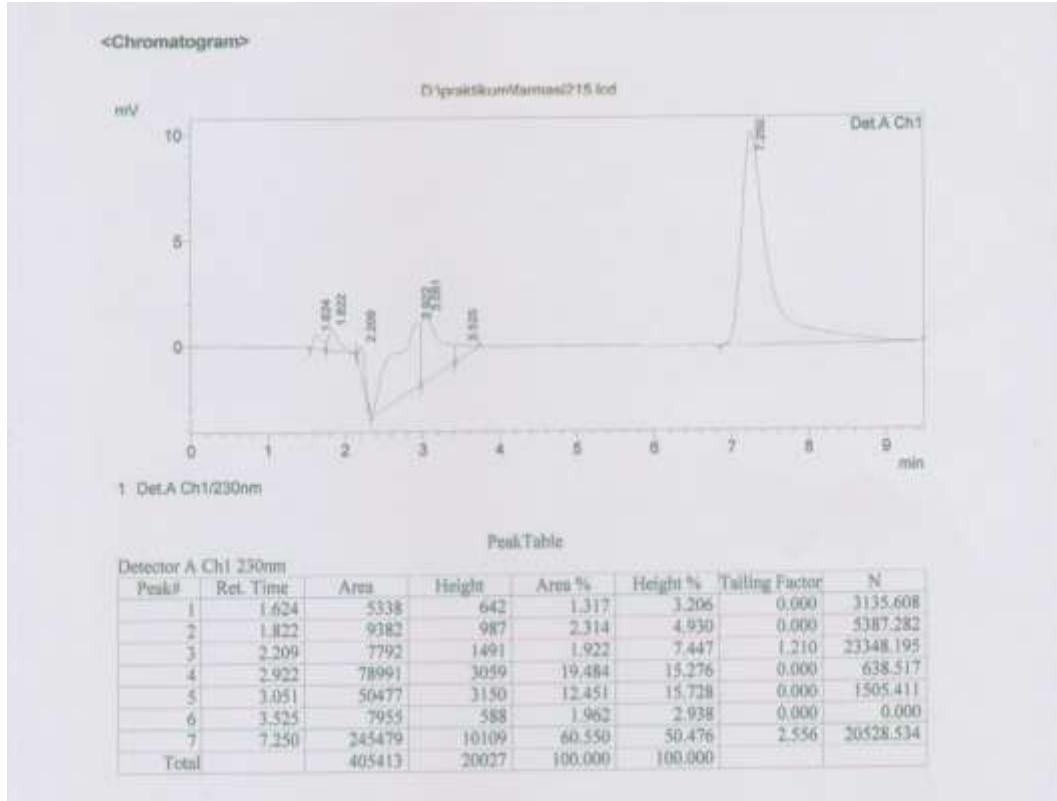
Gambar 14. Kromatogram kurva kalibrasi 3  $\mu\text{g/mL}$



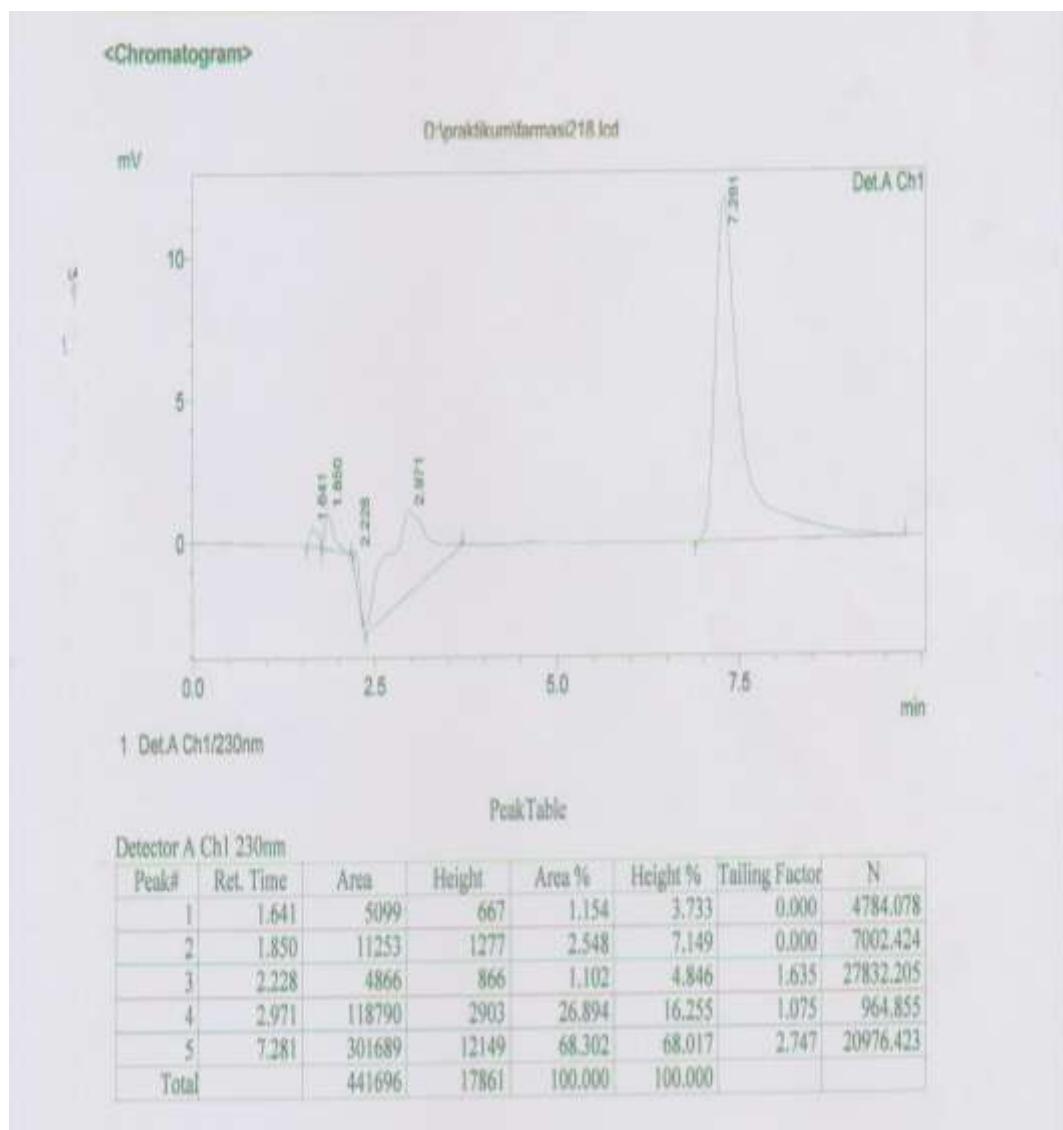
Gambar 15. Kromatogram kurva kalibrasi 4  $\mu\text{g/mL}$



**Gambar 16. Kromatogram kurva kalibrasi 5 µg/mL**



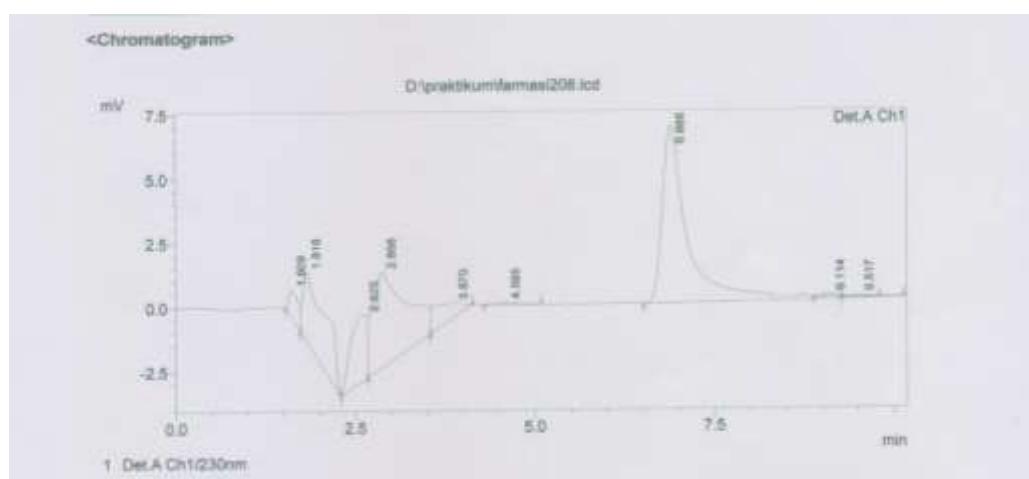
**Gambar 17. Kromatogram kurva kalibrasi 6 µg/mL**



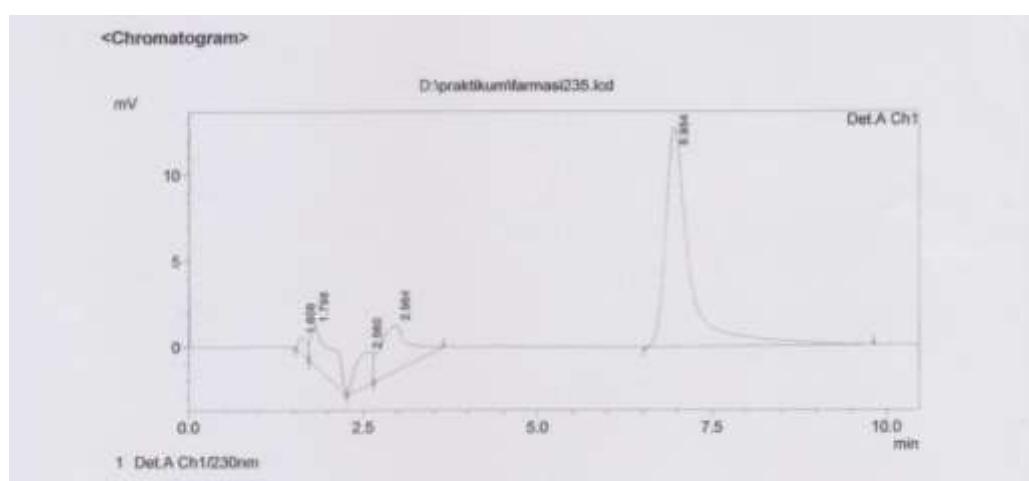
Gambar. 18. Kromatogram kurva kalibrasi 7  $\mu\text{g/mL}$



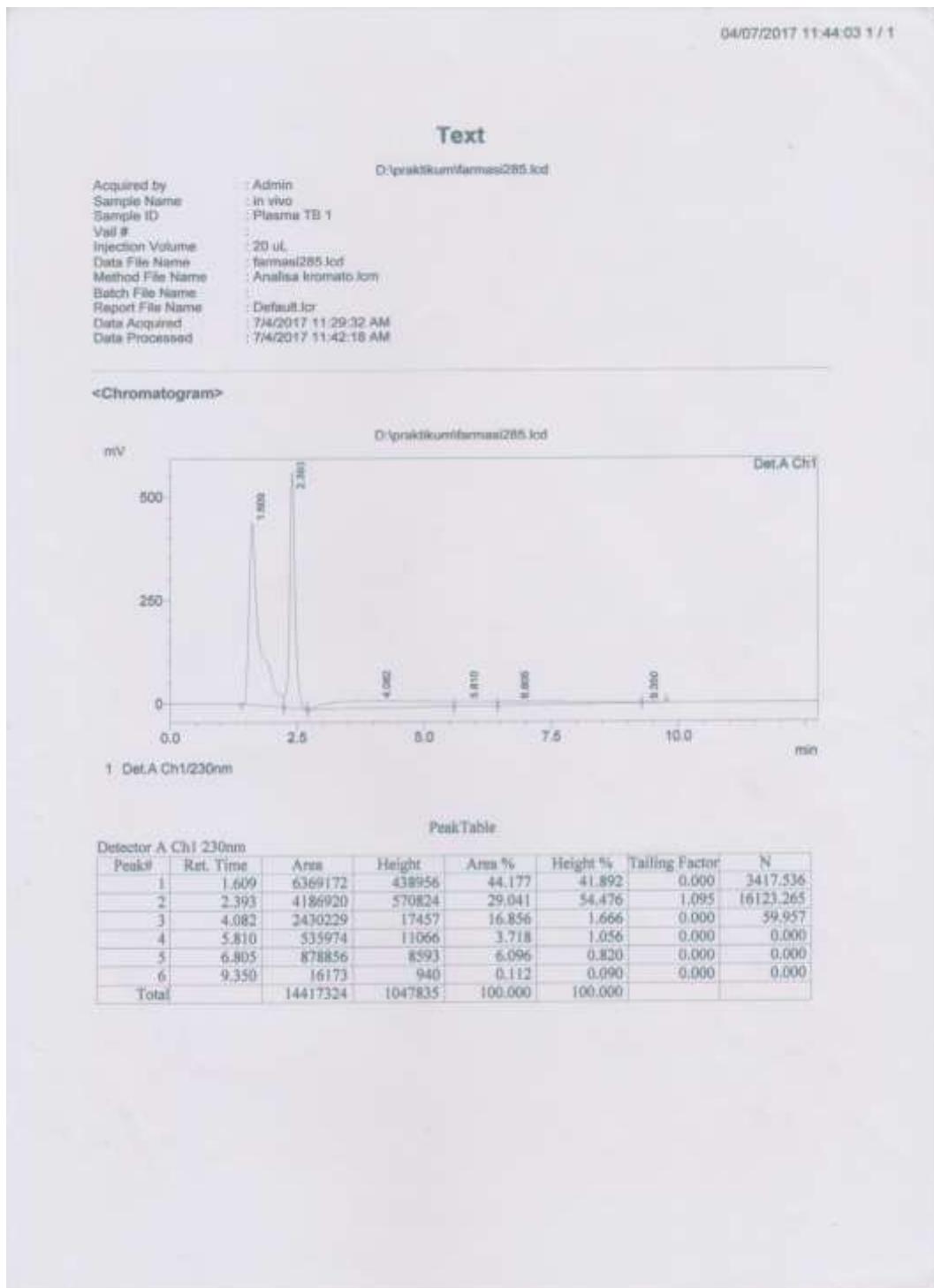
**Gambar 19. Kromatogram uji presisi 1 µg/mL**



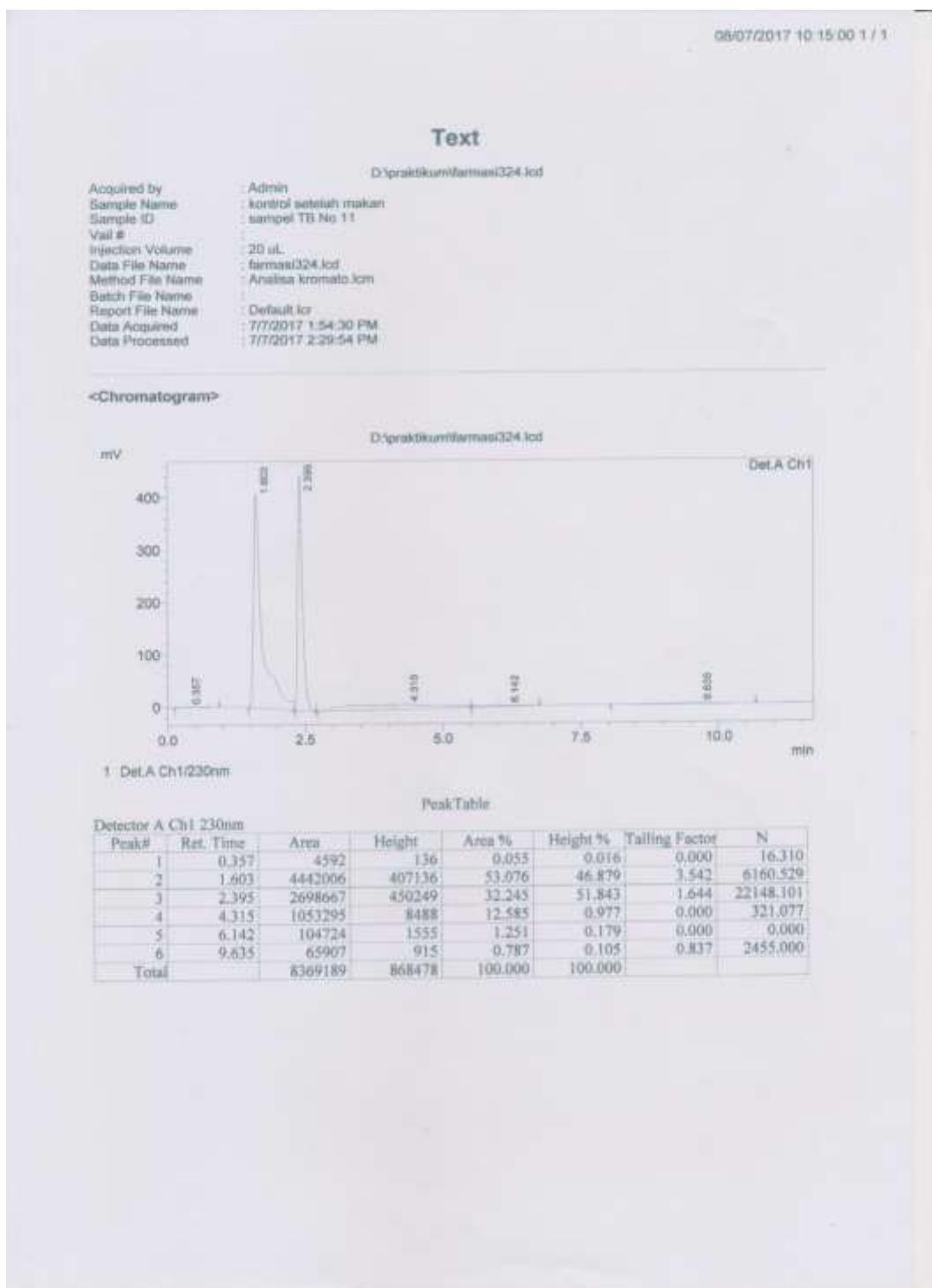
**Gambar 20. Kromatogram uji presisi 4 µg/mL**



**Gambar 21. Kromatogram uji presisi 7 µg/mL**



**Gambar 22. Kromatogram sampel TB sebelum makan**



**Gambar 23. Kromatogram sampel TB setelah makan**

Lampiran 12. Dokumentasi peneliti



**Instrumen kromatografi cair kinerja tinggi**



**Elmasonic**



Sentrifugator



pH meter



Syringe



Syringe filter



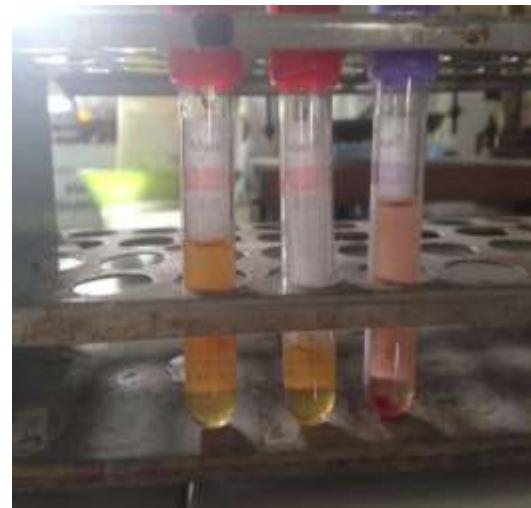
Membran filter



Baku isoniazid



Darah kontrol negatif



Plasma darah



Deproteinisasi plasma



Sampel plasma tuberkulosis



Vortex



Neraca analitik



**Mikropipet**



**Ice box**

## Lampiran 13. Uji statistik

**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
sebelummakan	3	15.4467	.91128	14.43	16.19
sesudahmakan	3	5.0933	1.60132	3.64	6.81

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

	sebelummakan	sesudahmakan
N	3	3
Normal Parameters <sup>a,b</sup>		
Mean	15.4467	5.0933
Std.	.91128	1.60132
Deviation		
Absolute	.285	.232
Most Extreme		
Differences		
Positive	.207	.232
Negative	-.285	-.191
Kolmogorov-Smirnov Z	.493	.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.968	.997

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Test of Homogeneity of Variances

#### perlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.882	1	4	.401

### Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	sebelummakan	15.4467	3	.91128
	sesudahmakan	5.0933	3	1.60132

### Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1	sebelummakan & sesudahmakan	3	.919

### Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)			
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference							
				Lower	Upper						
Pair 1	SebelumMakan - SesudahMakan	10.35333	.84441	.48752	8.25570	12.45097	21.237	2 .002			