

**PERBANDINGAN KADAR ISONIAZID SECARA
IN-VITRO TERHADAP KADAR *IN-VIVO***



Oleh:

**Dewi Oktavia Carolina Tubun
19133760A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**PERBANDINGAN KADAR ISONIAZID SECARA
IN-VITRO TERHADAP KADAR IN-VIVO**

SKRIPSI

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

Oleh :

**Dewi Oktavia Carolina Tubun
19133760A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

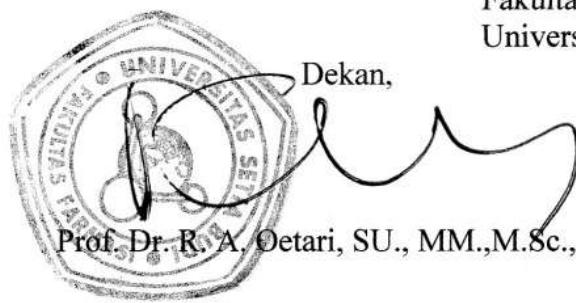
PENGESAHAN SKRIPSI
Berjudul

**PERBANDINGAN KADAR ISONIAZID SECARA
IN-VITRO TERHADAP KADAR *IN-VIVO***

Oleh :
Dewi Oktavia Carolina Tubun
19133760A

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

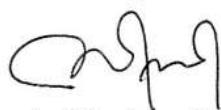
Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

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

Pembimbing



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

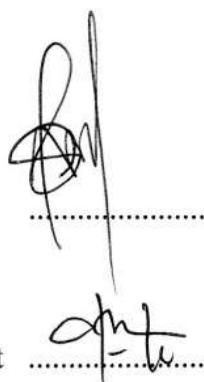
Pembimbing pendamping,



Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt

Penguji:

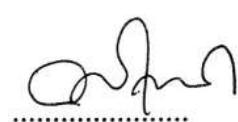
- 1 Iswandi, M.Farm., Apt
- 2 Dwi Ningsih, M.Farm., Apt
- 3 Opstaria saptarini, S.Farm., M.Si., Apt
- 4 Lucia Vita Inandha Dewi, M.Sc., Apt



A handwritten signature of Iswandi, M.Farm., Apt.



A handwritten signature of Dwi Ningsih, M.Farm., Apt.



A handwritten signature of Opstaria saptarini, S.Farm., M.Si., Apt.

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,



Dewi Oktavia C.T

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Karena Ia tahu jalan hidupku, seandainya Ia menguji aku, aku akan timbul seperti emas”

Ayub 23 : 10

“Sebab itu janganlah kamu kuatir akan hari esok, karena hari besok mempunyai kesusahannya sendiri. Kesusahan sehari cukuplah untuk sehari”

Matius 6 : 34

“Tetapi kamu ini, kuatkanlah hatimu, jangan lemah semangatmu, karena ada upah bagi usahamu”

2 Tawarikh 15:7

Karya ini aku persembahkan untuk

- *Tuhan Yesus Kristus yang memberikan kehidupan*
- *Mama yang selalu mendukungku dan memberikan segala yang aku butuhkan*
- *Alm. Papa yang selalu mendoakanku dari Surga*
- *Kak Lia, Kak Lius, Kak Yayan dan keluarga besarku*
- *Teman-teman yang selalu mendukungku dan mengajariku : Jen, Meme, Linda, Paung, Riris, Eci dan semuanya*

KATA PENGANTAR

Puji syukur pada Tuhan Yesus Kristus atas berkat dan kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini untuk memenuhi persyaratan guna mencapai gelar sarjana dalam Ilmu Farmasi pada Universitas Setia Budi.

Skripsi ini dalam penyusunannya penulis memilih judul **“PERBANDINGAN KADAR ISONIAZID SECARA IN-VITRO TERHADAP KADAR IN-VIVO”**. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini telah mendapat banyak bantuan dari pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA. Selaku rector 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, memberikan saran, nasihat dan semangat selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
4. Tim penguji Iswandi, M.Farm., Apt selaku penguji utama, Dwi Ningsih, M.Farm., Apt dan Opstaria saptarini, S.Farm., M.Si., Apt yang telah meluangkan waktu untuk menguji penulis, yang telah memberikan tambahan ilmu, petunjuk, kritik dan sarannya serta kesediaanya dalam menelaah skripsi ini.
5. Segenap Dosen, Asisten, Karyawan perpustakaan serta Staf Laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi yang banyak membantu kelancaran praktik penelitian skripsi ini.
6. Alm. Bapak dan mama yang tak putus memberikan dukungan moril, penghiburan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
7. Janyarsi Tambuli dan Nadia atas bantuan dan bersama-sama selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.

8. Berbagai pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, atas segala bantuan dan saran-sarannya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih belum sempurna dan masih banyak kekurangan. Tidak menutup kemungkinan penulis untuk menerima saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca pada umumnya dan penulis pada khususnya, untuk menambah pengetahuan lebih mendalam dan pengembangan ilmu farmasi.

Surkarta, 7 Agustus 2017

Dewi Oktavia C.T

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSEMPAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan Penelitian.....	2
D. Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
A. Tuberkulosis	3
B. Isoniazid	3
1. Pemerian dan kelarutan isoniazid.....	3
2. Mekanisme kerja	4
3. Farmakokinetika isoniazid	4
3.1 Absorbsi	4
3.2 Metabolisme	4
3.3 Ekskresi	4
4. Penggunaan pada tuberkulosis	5
5. Efek samping	5
C. Farmakokinetika	5
1. Pengertian farmakokinetika.....	5

2.	Faktor-faktor yang menentukan dalam proses farmakokinetika.....	6
3.	Model kompartemen.....	7
3.1	Model kompartemen satu terbuka	7
3.2	Model kompartemen dua terbuka.....	7
4.	Profil farmakokinetika.....	7
4.1	Absorbsi.....	8
4.2	Distribusi	8
4.3	Metabolisme	8
4.4	Eliminasi.....	8
5.	Interaksi farmakokinetik.....	8
5.1	Interaksi dalam proses absorbsi.....	8
5.2	Interaksi dalam proses distribusi	9
5.3	Interaksi dalam proses metabolisme.....	9
5.4	Interaksi dalam proses ekskresi	9
6.	Plasma	9
7.	Analisis obat dalam plasma darah	10
D.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	10
1.	Pengertian dan bentuk Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	10
2.	Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	11
2.1	Pompa.....	11
2.2	Infektor	11
2.3	Kolom.....	11
2.4	Detektor	12
2.5	Integrator	12
3.	Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	12
3.1	Analisis kualitatif.	12
3.2	Analisis kuantitatif.	13
3.3	Baku luar.	13
3.4	Baku dalam.....	13
4.	Validasi metode	13
4.1	Persisi	13
4.2	Ketepatan (akurasi).	13
4.3	Batas deteksi (<i>Limit of Detection</i> , LOD).....	13
4.4	Batas kuantifikasi (<i>Limit of Quantification</i> , LOQ).	14
4.5	Linearitas	14
4.6	Spesifitas	14
4.7	Kekasaran (<i>ruggedness</i>).	14
E.	Landasan Teori	14
F.	Hipotesis	15
BAB III	METODE PENELITIAN	16
A.	Populasi dan Sampel.....	16
1.	Kriteria inklusi.....	16
2.	Kriteria Eklusi	16
3.	Cara pengambilan sampel darah.....	16

B.	Variabel Penelitian	17
1.	Identifikasi variabel utama	17
2.	Klasifikasi variabel utama	17
3.	Definisi operasional variabel utama	18
C.	Alat dan Bahan	18
1.	Alat	18
2.	Bahan.....	18
D.	Jalannya Penelitian	18
1.	Larutan baku isoniazid.	18
2.	Penetapan panjang gelombang analisis.	18
3.	Fase gerak untuk KCKT.....	18
4.	Optimasi kondisi analisis.....	19
	4.1 Pemilihan kondisi analisis untuk isoniazid.	19
	4.2 Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis	19
	4.3 Pemilihan molaritas fase gerak untuk analisis	19
5.	Validasi metode	19
	5.1 Pembuatan kurva baku dan uji linearitas.....	19
	5.2 Pengukuran batas deteksi limit (<i>Limit of Detection, LOD</i>) dan batas kuantifikasi (<i>Limit of Quantification, LOQ</i>).	20
	5.3 Uji akurasi dan perolehan kembali. Larutan isoniazid dengan konsentrasi 1	20
	5.4 Uji presisi. Larutan baku isoniazid dengan konsentrasi 1	20
	5.5 Uji interferensi hasil pengotor plasma.....	20
6.	Penetapan kadar isoniazid pada plasma secara <i>in vitro</i>	20
7.	Pengambilan sampel.....	21
8.	Penetapan kadar isoniazid dalam plasma penderita tuberkulosis secara <i>in vivo</i>	21
E.	Analisa Data	21
	 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
1.	Penentuan panjang gelombang maksimum	23
2.	Optimasi kondisi analisis.....	23
	2.1 Penetapan metode analisis isoniazid.	23
	2.2 Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis.	23
	2.3 Pemilihan molaritas fase gerak untuk analisis.	24
	Molaritas.....	24
3.	Validasi Metode	24
	3.1 Persamaan kurva baku dan uji linearitas.....	24
	3.2 Batas deteksi LOD (<i>Limit of Detection</i>) dan LOQ (<i>Limit of Quantitation</i>).	25
	3.3 Uji akurasi dan perolehan kembali.....	25
	3.4 Uji presisi.	26
	3.5 Uji interferensi pengotor plasma.	27
4.	Penetapan kadar isoniazid secara <i>in vitro</i>	27

5. Penetapan kadar isoniazid secara <i>in vivo</i> .	27
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	29
A. Kesimpulan	29
B. Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Struktur isoniazid	3
Gambar 2. Skema nasib obat dalam tubuh.....	6
Gambar 3. Skema jalannya penelitian.....	22
Gambar 4. Kurva baku isoniazid.....	25

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Nilai N penetapan metode analisis isoniazid	23
Tabel 2. Nilai N molaritas fase gerak untuk analisis	24
Tabel 3. Persamaan kurva baku	24
Tabel 4. Data <i>LOD</i> dan <i>LOQ</i>	25
Tabel 5. Hasil uji akurasi dan perolehan kembali	26
Tabel 6. Hasil uji presisi.....	27
Tabel 7. Penetapan kadar isoniazid secara <i>in vitro</i>	27
Tabel 8. Penetapan kadar secara <i>in vivo</i>	28

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1.	Surat kelaikan etik	34
Lampiran 2.	Sertifikat analisis isoniazid.....	35
Lampiran 3.	Foto alat PHmeter dan alat KCKT	36
Lampiran 4.	Foto syringe 20 μ L dan ultrasonic cleaner	37
Lampiran 5.	Foto alat sentrifugasi dan membran whatman 0.45 μ m	38
Lampiran 6.	Foto timbangan analitik dan alat vortex	39
Lampiran 7.	Foto mikropipet	40
Lampiran 8.	Foto pemilihan panjang gelombang isoniazid menggunakan spektroskopi UV-Vis	41
Lampiran 9.	Plasma darah sehat dan plasma pasien tuberkulosis.....	42
Lampiran 10.	Foto analisis sampel pasien tuberkulosis.....	43
Lampiran 11.	Foto kurva baku isoniazid	44
Lampiran 12.	Kurva baku isoniazid 1 ppm.....	45
Lampiran 13.	Kurva baku isoniazid 2 ppm.....	46
Lampiran 14.	Kurva baku isoniazid 3 ppm.....	47
Lampiran 15.	Kurva baku isoniazid 4 ppm.....	48
Lampiran 16.	Kurva baku isoniazid 5 ppm.....	49
Lampiran 17.	Kurva baku isoniazid 6 ppm.....	50
Lampiran 18.	Kurva baku isoniazid 7 ppm.....	51
Lampiran 19.	Kromatogram presisi 1 ppm	52
Lampiran 20.	Kromatogram uji presisi 4 ppm	53
Lampiran 21.	Kromatogram uji presisi 7 ppm	54
Lampiran 22.	Kromatogram uji interferensi pengotor plasma.....	55
Lampiran 23.	Kromatogram isoniazid dalam plasma darah secara <i>in vitro</i>	56

Lampiran 24. Kromatogram penyuntikan sampel plasma pasien TB	57
Lampiran 25. Optimasi Kondisi analisis	58
Lampiran 26. Kurva Baku.....	59
Lampiran 27. LOD dan LOQ	60
Lampiran 28. Data hasil uji akurasi dan perolehan kembali	61
Lampiran 29. Uji presisi.....	63
Lampiran 30. Penetapan kadar secara <i>in vitro</i>	64
Lampiran 31. Penetapan Kadar secara <i>in vivo</i>	65
Lampiran 32. Data statistik perbandingan kadar isoniazid secara <i>in vitro</i> terhadap kadar <i>in vivo</i>	66

INTISARI

Oktavia, D., 2017, PERBANDINGAN KADAR ISONIAZID SECARA *IN-VITRO* TERHADAP KADAR *IN-VIVO*

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menyerang berbagai organ, terutama paru-paru. Isoniazid digunakan untuk mengobati penyakit tuberkulosis, sebagian besar pasien tuberkulosis dapat disembuhkan dengan isoniazid. Mekanisme kerja isoniazid dengan menghambat sintesis dinding sel asam mikolat melalui jalur yang tergantung dengan oksigen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo*.

Penelitian ini menggunakan plasma darah sehat yang diberikan kadar isoniazid 300 µg/mL secara *in vitro* dan plasma darah pasien tuberkulosis yang menkonsumsi obat antituberkulosis fase lanjut. Analisis kadar plasma menggunakan KCKT kolom C-18 dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat dan asetonitril 99:1. Data yang diperoleh dianalisa dengan uji *T-test*.

Hasil penelitian menunjukan bahwa perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo* diperoleh kadar *in vitro* yaitu 8,525 µg/mL dan kadar *in vivo* yaitu 5,091 µg/mL.

Kata kunci : Isoniazid, *in vitro*, *in vivo*, KCKT

ABSTRACT

Oktavia, D., 2017, PERBANDINGAN KADAR ISONIAZID SECARA IN-VITRO TERHADAP KADAR IN-VIVO

Tuberculosis is a infectious disease caused by Mycobacterium tuberculosis bacteria, which can attacking various organs, especially lungs. Isoniazid is used to treat tuberculosis, most tuberculosis patients can be healed with isoniazid. The mechanism of action isoniazid inhibiting the synthesis micolat acid cell walls via an oxygen-dependent pathway. This study aims to determine the comparison of isoniazid levels in vitro to in vivo levels.

This study uses healthy blood plasma given isoniazid levels 300 µg/mL in vitro and blood plasma of tuberculosis patients taking continuous phase antituberculosis drugs. Analysis of plasma levels using a C-18 HPLC column and mobile phase potassium dihydrogen phosphate and acetonitrile 99:1. The data were analyzed by t-Test.

The result showed that the ratio of isoniazid content in vitro to in vivo levels obtained in vitro levels is 8,525 µg/mL and in vivo levels is 5,091 µg/mL.

Keywords : isoniazid, in vitro, in vivo, HPLC

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan suatu penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menyerang berbagai organ, terutama paru-paru. Penyakit TBC merupakan salah satu penyakit yang telah lama dikenal dan sampai saat ini masih menjadi penyebab utama kematian didunia (Depkes, 2007).

Isoniazid (INH) diperkenalkan pada tahun 1952 sebagai obat yang cukup efektif dalam pengobatan tuberculosis dan sebagian besar pasien atau penderita dapat disembuhkan dengan obat tersebut (Katzung, 1998). Mekanisme kerja isoniazid dengan menghambat sintesis dinding sel asam mikolat melalui jalur yang tergantung dengan oksigen. Isoniazid mengalami inaktivasi di hati melalui proses asetilasi menjadi asam asetil isoniazid yang kemudian dihidrolisis menjadi asetilhidrazin bebas dan oleh enzim sitokrom P450 diubah menjadi bahan metabolit yang toksik (Fatayah, 2012).

Metabolisme utama isoniazid adalah melalui asetilasi dihati oleh enzim N-acetyl transferase yang menghasilkan asetilhidrazin. Kecepatan metabolisme isoniazid dipengaruhi oleh faktor genetik yang secara bermakna mempengaruhi kadar obat dalam plasma dan waktu paruhnya. Isoniazid diekskresikan melalui urin pada waktu 24 jam antara 75-95 % dalam bentuk metabolit. Ekskresi utama dalam bentuk asetil isoniazid yang merupakan proses asam nikotinat dan asetilasi yang merupakan metabolit proses hidrolisis (Istantoro & Setiabudy, 2007).

Tersedia berbagai pilihan rute pemberian obat, sehingga pengetahuan tentang keuntungan dan kerugian rute-rute pemberian yang berbeda sangat penting. Penggunaan secara oral merupakan cara yang paling umum digunakan dalam pemberian obat. Rute tersebut merupakan rute yang paling aman, nyaman dan murah (Goodman & Gilman, 2008).

Analisis isoniazid dapat dilakukan secara nitrimetri, bromometri, spektrofotometri dan kromatografi cair kinerja tinggi. Kadar obat dalam cairan

biologis umumnya sangat kecil sehingga metode yang dapat digunakan untuk menetapkan kadar, juga mampu melakukan pemisahan. Sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar obat dalam cairan biologi (Hadjar, 1985). Maka digunakan metode secara kromatografi cair kinerja tinggi untuk memeriksa kadar isoniazid dalam plasma.

Berdasarkan hal tersebut maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo*.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, permasalahan yang diteliti dalam penelitian ini adalah bagaimana perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo*.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (IPTEK).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

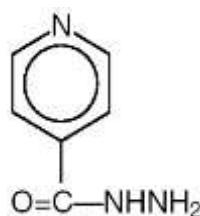
A. Tuberkulosis

Tuberkulosis, singkatnya TB adalah suatu penyakit menular yang paling sering terjadi di paru-paru. Penyebabnya adalah suatu basil gram positif tahan asam dengan pertumbuhan sangat lambat, yakni *Mycrobacterium tuberculosis*. Gejala TB antara lain batuk kronis, demam, berkeringat waktu malam, keluhan pernafasan, perasaan letih, dan rasa nyeri dibagian dada. Dahak penderita berupa lendir, purulent atau mengandung darah (Tjay dan Rahardja, 2002).

Setelah terjadinya infeksi melalui saluran pernafasan, di dalam gelembung paru (alveoli) berlangsung reaksi peradangan setempat dengan timbulnya benjolan-benjolan kecil (tuberkel). Penyakit TB ditularkan dari orang ke orang terutama melalui saluran pernafasan dengan menhisap atau menelan tetesan ludah yang mengandung basil dan dibatukkan oleh penderita TB terbuka atau adanya kontak antara tetes ludah tersebut dengan luka di kulit (Tjay dan Rahardja, 2002).

B. Isoniazid

Isoniazid adalah asam isonikotinat hidrazid, yang sering disebut INH dan memiliki rumus molekul $C_6H_7N_3O$. Obat ini merupakan molekul sederhana yang kecil dengan (BM 137,1 g/mol) dan mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol. Indikasi dari isoniazid sebagai antituberkulosis.



Gambar 1. Struktur isoniazid

1. Pemerian dan kelarutan isoniazid

Pemerian isoniazid yaitu hablur tidak berwarna atau serbuk hablur putih, rasa agak pahit, tidak berbau, terurai perlahan-lahan oleh cahaya dan udara.

Kelarutan mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam *etanol (95%) P*, sukar larut dalam *kloroform P* dan dalam *eter P* (Anonim, 1979).

2. Mekanisme kerja

Isoniazid menghambat jalur biosintesis dari asam mikolat dengan menghambat pembentukan dari rantai asam lemak yang sangat panjang yang merupakan bentuk awal asam mikolat (Istantoro & Setiabudy, 2007). Organisme yang rentan terhadap isoniazid adalah *Mycrobacterium tuberculosis*. Efek bakterisidnya hanya terlihat pada kuman yang sedang tumbuh secara aktif (Istantoro & Setiabudy, 2007).

3. Farmakokinetika isoniazid

3.1 Absorbsi. Isoniazid diabsorbsi secara cepat pada saluran pencernaan dan menghasilkan kadar puncak pada plasma 3-5 µg/mL dalam 1-2 jam setelah pemberian oral (Katzung, 2004). Isoniazid terdifusi secara cepat menuju seluruh cairan tubuh dan jaringan. Konsentrasi pada susunan saraf pusat dan serebrospinal kurang lebih 1/5 dari kadar plasma. Kadar obat pada ekstraseluler dan intraseluler sama (Katzung, 2010).

3.2 Metabolisme. Konsentrasi rata-rata isoniazid aktif dalam plasma dari inaktivator cepat kurang lebih 1/3-1/2 dari konsentrasi rata-rata inaktivator lambat. Waktu rata-rata isoniazid pada inaktivator kurang dari 1-1/2 jam, sedangkan pada inaktivator lambat yaitu 3 jam. Kecepatan asetilasi sedikit pengaruhnya dalam regimen dosis harian tetapi mungkin dapat menganggu aktivitas antimikrobakteri pada pemberian isoniazid 1-2 kali seminggu (Katzung, 2010).

3.3 Ekskresi. Isoniazid diekskresikan terutama melalui urin sebagian besar dalam bentuk obat utuh, sebagian besar sebagai konjugat lain. Jumlah bentuk utuh, isoniazid bebas dalam urin lebih tinggi dibandingkan inaktivator lambat. Pada gagal ginjal, dosis normal pada isoniazid dapat diberikan biasanya, tetapi pada insufisiensi hepatis berat, dosisnya harus diturunkan (Katzung, 2010).

4. Penggunaan pada tuberkulosis

Penggunaan isoniazid biasanya dikombinasikan dengan obat anti tuberculosis lainnya seperti rifampisin (Istantoro & Setiabudy, 2007). Isoniazid merupakan salah satu obat antituberkulosis yang memiliki efek paling kuat terhadap *M. tuberculosis*. Isoniazid adalah obat antituberkulosis yang sering digunakan.

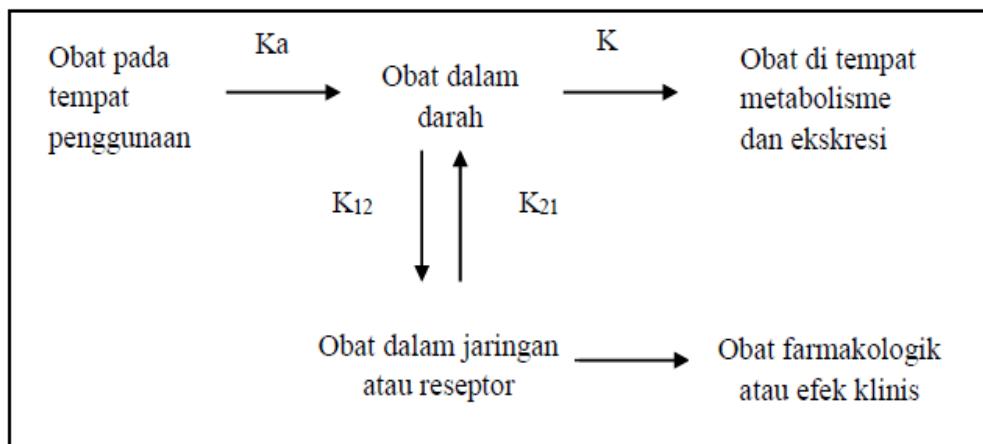
5. Efek samping

Beratnya efek samping yang ditimbulkan dari isoniazid berkaitan dengan dosis dan lama pemberiannya. Reaksi alergi yang ditimbulkan biasanya demam, kulit kemerahan dan hepatitis yang jarang terjadi. Efek toksik yang paling sering terjadi (10-20%) pada sistem syaraf perifer dan pusat. Kemudian didukung adanya defisiensi piridoksin, mungkin merupakan hasil kompetisi isoniazid dengan piridoksal fosfat terhadap apotriptofanase. Reaksi toksik yang termasuk neuritis perifer, insomnia, retensi urin, lesu (Katzung, 2010).

C. Farmakokinetika

1. Pengertian farmakokinetika

Farmakokinetika adalah ilmu yang mempelajari mengenai kinetika obat didalam tubuh. Farmakokinetika atau kinetika adalah bagian dari ilmu farmakologi secara khusus mempelajari perubahan konsentrasi obat dan metabolitnya di dalam darah dan jaringan sebagai fungsi dari proses yang akan menentukan kinetika obat di dalam tubuh yang meliputi proses absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi obat dalam tubuh serta kaitannya dengan respon terapeutik, farmakologi dan toksikologi pada manusia serta hewan (Tan dan Raharja, 2007). Obat berada dalam tubuh mengalami perjalanan dari suatu organ ke organ yang lain dimana sifat fisika-kimia obat sangat mempengaruhi proses nasib obat dalam organ-organ tersebut. Farmakokinetika juga seringkali disebut dengan ilmu yang mempelajari nasib obat dalam tubuh (Soetarno, 2009). Skema nasib obat dalam tubuh dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Skema nasib obat dalam tubuh

Keterangan :

K_a : tetapan laju absorpsi

K : tetapan laju eliminasi

K_{12} : tetapan laju obat dari darah ke jaringan

K_{21} : tetapan laju obat dari jaringan ke darah

Parameter farmakokinetika obat dihitung dari konsentrasi obat dalam cuplikan hayati yang sesuai, dapat berupa: urin, darah, dahak, air ludah, cairan yang relavan atau yang mengandung obat. Urin atau darah adalah cuplikan yang paling sering digunakan (Soetarno, 2009).

2. Faktor-faktor yang menentukan dalam proses farmakokinetika

Faktor-faktor yang menentukan pada proses farmakokinetika adalah pertama, sistem kompartemen dalam cairan seperti: cairan intrasel, cairan ekstrasel (cairan intestinal, cairan cerebrospinal, plasma darah) dan bermacam fase lipofil dalam tubuh. Kedua, protein jaringan, protein plasma, dan berbagai senyawa biologis yang mungkin akan mengikat obat. Ketiga, distribusi obat dalam berbagai sistem kompartemen biologis, terutama antara hubungan kadar obat dalam berbagai sistem tersebut dan waktu, yang menentukan kinetika obat. Keempat dosis sediaan obat dan transport dengan kompartemen seperti absorpsi bioaktivasi, biodregadasi, dan eksresi yang menentukan lamanya obat dalam tubuh (Siswandono dan Sekardjo, 2000).

Obat yang dianalisis dalam cairan hayati perlu memperhatikan hal-hal yang penting dalam farmakokinetika yang digunakan sebagai penetapan kadar obat dalam cairan tubuh (dalam darah) metode yang digunakan tergantung sifat

kimia fisika obat, jumlah dan sifat cairan biologis (serum dan urin), konsentrasi yang diukur, keterampilan dari praktikan, instrument yang tersedia. Metode yang digunakan untuk penetapan kadar obat dalam serum hendaknya telah berkenan dengan spesifitas, linearitas, kepekaan, ketepatan, ketelitian dan stabilitas sehingga diperoleh hasil yang akurat (Shargel, 2005).

3. Model kompartemen

3.1 Model kompartemen satu terbuka. Tubuh dianggap hanya satu kompartemen, dimana obat yang dimasukan ke dalam tubuh akan segera mencapai setimbang antar obat dalam darah dengan obat dalam jaringan atau cairan tubuh yang lain (Soetarno, 2009). Model ini tidak dianggap bahwa konsentrasi obat dalam tiap jaringan tersebut adalah sama pada berbagai waktu (Shargel & Yu, 1998).

3.2 Model kompartemen dua terbuka. Model dua kompartemen ini pada prinsipnya sama dengan model satu kompartemen, bedanya terdapat dalam proses distribusi karena adanya kompartemen perifer, eliminasi tetap dari kompartemen sentral. Model ini sesuai untuk banyak obat.

Dalam model kompartemen dua dianggap bahwa obat terdistribusi ke dalam dua kompartemen. Kompartemen kesatu dikenal sebagai kompartemen sentral, yaitu darah, cairan ekstraseluler, dan jaringan-jaringan dengan perfusi tinggi, kompartemen-kompartemen ini secara cepat terdifusi oleh obat.

Kompartemen kedua merupakan kompartemen jaringan, yang berisi jaringan-jaringan yang berkesetimbangan secara lebih lambat dengan obat. Model ini menganggap obat dieliminasi dari kompartemen sentral (Shargel & Yu, 1998).

4. Profil farmakokinetika

Profil farmakokinetika adalah suatu besaran yang diturunkan secara metematis dari hasil penetapan kadar obat dalam darah, urin. Parameter farmakokinetika diperoleh dari perubahan perubahan konsentrasi bahan obat dan metabolitnya dalam cairan darah dan dalam urin terhadap waktu. Kedua cairan itu mudah dilewati dan konsentrasi dalam darah yaitu transpornya, mencerminkan proses kinetika dalam organisme (Mustchler, 1999).

4.1 Absorbsi. Faktor-faktor seperti luas permukaan dinding usus, kecepatan pengosongan lambung, pergerakan saluran cerna dan aliran darah ke tempat absorbs, semuanya mempengaruhi laju dan jumlah absorbsi obat. Model farmakokinetika menganggap absorbs mengikuti orde kesatu, kecuali apabila, anggapan absorbsi orde nol memperbaiki model secara bermakna atau telah teruji dengan percobaan (Shargel & Yu, 2005). Profil farmakokinetika yang digunakan untuk menilai kinetika absorbsi meliputi tetapan kecepatan absorbsi (K_a), luas daerah dibawah kurva (AUC), dan fraksi obat yang diabsorbsi (f_a). Nilai K_a didapat dari perhitungan dengan metode residual.

4.2 Distribusi. Volume distribusi kompartemen sentral (V_c) berguna untuk menggambarkan perubahan konsentrasi obat, oleh karena kompartemen sentral umumnya merupakan kompartemen yang diambil sebagai kompartemen cuplikan. Volume distribusi keadaan tunak (V_{dss}) menggambarkan laju obat yang masuk ke dalam kompartemen jaringan dari kompartemen sentral adalah sama dengan laju obat yang keluar dari kompartemen jaringan kedalam kompartemen sentral.

4.3 Metabolisme. Reaksi biotransformasi obat diklasifikasikan menjadi reaksi fungsionalisasi fase I, dan reaksi biosintesis (konjugasi) fase II. Enzim sitokrom P450 terlibat dalam metabolisme senyawa endogen dan eksogen yang beragam secara kimia ini seperti obat, zat kimia lingkungan dan xenobiotik lain.

4.4 Eliminasi. Eliminasi merupakan suatu proses pengeluaran zat dari tubuh, organ yang berhubungan dengan eliminasi seperti hati, ginjal dan sebagainya. Proses eliminasi ditunjukan dari penurunan profil farmakokinetika dari suatu obat. Profil farmakokinetika yang digunakan sebagai tolak ukur eliminasi suatu obat meliputi C_{l_r} (pembersihan total) yang mencerminkan volume kompartemen sentral yang dibersihkan dari obat tiap satuan waktu, dan K_{el} yang mencerminkan fraksi obat tak berubah yang dieliminasi dari kompartemen sentral tiap satuan waktu.

5. Interaksi farmakokinetik

5.1 Interaksi dalam proses absorbsi. Interaksi pada proses absorbsi dapat terjadi dengan berbagai cara contohnya penurunan motilitas gastrointestinal.

Kebanyakan obat sebagian besar diserap pada bagian usus kecil, obat-obatan yang mengubah laju pengosongan lambung dapat mempengaruhi absorpsi.

5.2 Interaksi dalam proses distribusi. Setelah obat diabsorbsi, obat dengan cepat didistribusikan keseluruh tubuh oleh sirkulasi. Ikatan obat dengan protein plasma sifatnya reversibel, kesetimbangan dibentuk antara molekul-molekul yang tidak terikat dan yang terikat. Hanya molekul yang tidak terikat yang tetap bebas dan aktif secara farmakologi (Stockley, 2008).

5.3 Interaksi dalam proses metabolisme. Interaksi yang terjadi dalam proses metabolisme ada dua kemungkinan yaitu pemanjangan (enzyme induction) suatu obat dapat memperlambat metabolisme obat lain sehingga mempercepat eliminasi obat tersebut dan penghambatan enzim jadi metabolisme yakni suatu obat dihambat dengan obat lain. Obat-obat yang dikenal dapat menghambat aktivitas enzim metabolism obat adalah isoniazid, kloramfenikol, propranolol, simetidin, fenilbutazon, alupurinol (Anonim, 2003).

5.4 Interaksi dalam proses ekskresi. Ketika aliran darah melalui ginjal dikendalikan dengan produksinya vasodilator prostaglandin ginjal. Ketika sintesis prostaglandin ini dihambat, ekskresi beberapa obat dari ginjal akan berkurang (Stockley, 2008).

6. Plasma

Darah terdiri dari sel darah merah, sel darah putih, dan pelat darah, yang tersuspensi dalam plasma (Tjay dan Rahardja, 2002). Plasma darah merupakan bagian cair darah. Cairan ini didapat dengan membuat darah tidak beku dan sel darah tersentrifugasi. Plasma terdiri dari 90% air, 7-8% protein, dan di dalam plasma terkandung beberapa komponen lain. Komponen lain yang terdapat dalam plasma seperti garam-garam, karbohidrat, lipid dan asam amino, karena dinding kapiler permukaan bagi air dan elektrolit maka plasma darah selalu ada dalam pertukaran zat dengan cairan intestinal. Cairan plasma bertukaran dengan intestinal sekitar 70% dalam waktu 1 menit. Serum darah adalah cairan bening yang memisah setelah darah dibekukan. Plasma darah dengan serum darah terutama pada serum tidak terdapat faktor pembentuk fibrinogen.

7. Analisis obat dalam plasma darah

Analisis obat pada plasma merupakan sampel yang paling umum digunakan karena ada hubungan yang baik antara konsentrasi obat dalam plasma dengan efek terapeutik yang ditimbulkan (Kelly, 1992). Dalam beberapa kasus, konsentrasi obat dalam plasma diukur mencapai level microgram sampai nanogram maka, dapat digunakan metode KCKT. Salah satu keuntungan dari KCKT adalah dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (Johnson dan Stevenson, 1991).

D. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. Pengertian dan bentuk Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan teknik pemisahan campuran berdasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran antara dua fase yaitu fase diam (padat) dan fase gerak (cair). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi menurut Farmakope edisi IV adalah metode pemisahan dengan efisiensi dan kecepatan yang tinggi menggunakan teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi dan detector yang sensitif (Anonim, 1995).

KCKT memiliki beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan kromatografi cair tradisional antara lain kolom dapat dipakai berulang, cepat, mudah memperoleh kembali cuplikan dan dapat menganalisis senyawa dengan titik didih tinggi atau berat molekul tinggi (Anonim, 1995). Tujuan KCKT adalah untuk mendapatkan pemisahan yang baik dalam waktu relative cepat. Hal-hal yang perlu diperhatikan untuk mencapai maksud dan tujuan analisis antara lain dengan pemilihan pelarut penggembang atau pelarut penggembang campur sesuai dengan komponen yang digunakan, pemilihan kolom yang sesuai dengan pelarut penggembangnya, penggunaan detektor yang memadai dan perlunya pengetahuan dasar KCKT yang baik serta pengalaman dan keterampilan kerja yang baik (Mulja & Suharman, 1995).

Prinsip kerja KCKT adalah sebagai berikut: dengan bantuan pompa fase gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan kedalam aliran fase gerak cara penyuntikan. Pemisahan komponen-komponen campuran

terjadi di dalam kolom. Terjadi perbedaan kekuatan interaksi antar solute dan fase diam akan bertahan lebih lama didalam kolom. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom akan terdeteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram (Hendayana, 2006).

2. Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Instrument kromatografi cair kinerja tinggi pada dasarnya terdiri atas: pompa, injector, kolom dan detektor.

2.1 Pompa. Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluent ke dalam kolom. Syarat sistem pompa adalah memberikan tekanan sampai 600 psi, memberikan kecepatan aliran 0,1-10 ml/menit, aliran terkontrol dengan reproduksinilitas 0,5%, antikarat oleh sebab itu seal pompa terbuat dari bahan baja atau Teflon. Gangguan pada pompa biasanya karena perawatan kurang teratur, pelarut yang tidak difiltrasi dengan baik, adanya elektrolit yang mengandung kadar klorida yang tinggi pada pH yang rendah dan terjadinya endapan pada pompa (Mulja dan Suhaman 1995).

2.2 Injektor. Digunakan untuk memasukan cuplikan kedalam kolom. Ada tiga tipe dasar injector yang dapat digunakan yaitu:

2.2.1 Stop-flow. Aliran dihentikan, injeksi dilakukan pada kinerja atmosfir, sistem tertutup dan aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi didalam cairan kecil dan resolusi tidak dipengaruhi.

2.2.2 Sputum. Sputum merupakan injektor langsung pada aliran yang sama dengan injektor yang lazim dipakai pada kromatografi gas.

2.2.3 Katup jalan-kitar. Katup jalan-kitar biasanya dipakai untuk menyuntikan volume yang lebih besar dari μ l dan sekarang dipakai dalam sistem diotomatiskan.

2.2.4 Auto injektor. Auto injektor merupakan otomatisasi jalan-kitar.

2.3 Kolom. Kolom merupakan jantung kromatografi. Kolom dibagi menjadi 2 kelompok.

2.3.1 Kolom analitik. Kolom analitik dari setengah dalam 2-6 mm, panjang kolom untuk partikel biasanya 50-100 cm dan untuk mikropartikel berpori.

2.3.2 Kolom preparatif. Kolom preparatif umumnya berdiameter 6 mm atau lebih besar dan panjang 25-100 cm. fungsi dari kolom kromatografi adalah memisahkan masing-masing komponen. Kolom pada umumnya terbuat dari baja yang tahan karat. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam memilih kolom yaitu panjang kolom, pengisi kolom, diameter kolom, fase gerak dan tekanan kolom.

2.4 Detektor. Detektor berfungsi mendeteksi dan mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Syarat detektor adalah sensitivitas sangat tinggi (10^{-8} - 10^{-15} g solute/detik), kesetabilan dan reproducibilitas yang sangat baik, memberikan respon yang linier terhadap konsentrasi pelarut, dapat bekerja pada temperature kamar sampai 400°C , tidak dipengaruhi perubahan temperature dan kecepatan pelarut pengembang, mudah didapat dan mudah pemakaianya, dapat selektif terhadap macam-macam pelarut di dalam larutan penggembang, tidak merusak sampel (Mulja dan Suharman 1995).

2.5 Integrator. Intergrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Macam intergrator ada 2 yaitu integrator piringan yang bekerja secara mekanik dan intergrator digital yang atau elektronik yang dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu intergrasi yang singkat (Grriter *et al*, 1991).

2.5.1 Integrator piringan. Bekerja secara mekanik

2.5.2 Integrator digital atau elektronik. Integrator elektronik mengubah sinyal kromatografi menjadi bentuk angka otomatis dan sangat tepat (Jhonson dan Stevenson, 1991).

3. Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Analisis dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif.

3.1 Analisis kualitatif. Analisis kualitatif dapat dilihat dari waktu retensi (t_R) dan volume retensi (V_r).

Keterangan:

Vr = Volume pelarut yang diperlukan untuk mengelusi cuplikan dari kolom

tR = Waktu yang diperlukan untuk mengelusi cuplikan

Fc = Kecepatan aliran

Cara yang terbaik untuk analisis kualitatif adalah menggunakan metode waktu relative, yaitu:

3.2 Analisis kuantitatif. Analisis kuantitatif pada KCKT, dasar perhitungannya adalah dengan mengukur luas puncak zat yang dianalisis. Metode yang dapat digunakan yaitu:

3.3 Baku luar. Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikan dan diukur luas puncaknya, kemudian dibuat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Larutan sampel diperoleh dengan cara memplot puncak sampel pada kurva kalibrasi atau dengan perbandingan langsung.

3.4 Baku dalam. Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikan dan dihitung perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan cara ini deperlukan baku dalam yang tepat (Jhonson dan Stevenson, 1991).

4. Validasi metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Gandjar dan Rohman, 2013)

4.1 Persisi. Merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relative dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik.

4.2 Ketepatan (akurasi). Akurasi merupakan ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konversi, nilai sebenarnya atau nilai rujukan.

4.3 Batas deteksi (*Limit of Detection, LOD*). Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih terdeteksi. Batas deteksi merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit diatas atau dibawah nilai tertentu. Batas deteksi dapat dihitung berdasarkan standar deviasi

(SD) respond an kemiringan (*slope*) kurva baku pada level yang mendekati LOD. Limit of detection (LOD) = $3,3(\text{SD}/\text{S})$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blangko, standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi *intercept* y pada garis regresi (Gandjar dan Rohman 2013).

4.4 Batas kuantifikasi (*Limit of Quantification, LOQ*). Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan persisi dan akurasi yang dapat diterima, pada kondisi operasional metode yang digunakan. Rumus LOQ (*Limit of Quantification*)= $10(\text{SD}/\text{S})$.

4.5 Linearitas. Lineritas merupakan komponen suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan (Gandjar dan Rohman, 2013).

4.6 Spesifitas. Merupakan kemampuan untuk mengukur nalait yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi dan komponen matriks.

4.7 Kekasaran (*ruggedness*). Adalah tingkat reproduksibilitas hasil yang diperoleh dibawah kondisi bermacam-macam yang diekspresikan sebagai persen standar deviasi relative (%RSD). Kondisi-kondisi ini meliputi laboratorium, analisis, alat, reagen dan waktu percobaan yang berbeda (Gandjar dan Rohman 2013).

E. Landasan Teori

Isoniazid adalah obat antituberkulosis yang sering digunakan. Penggunaan isoniazid biasanya di kombinasikan dengan obat anti tuberculosis lainnya seperti rifampisin (Istantoro & Setiabudy, 2007). Isoniazid merupakan salah satu obat antituberkulosis yang memiliki efek paling kuat terhadap *M. tuberculosis*.

Isoniazid diabsorbsi secara cepat pada saluran pencernaan dan menghasilkan kadar puncak pada plasma 3-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam 1-2 jam setelah pemberian oral (Katzung, 2004) dan isoniazid diekskresikan terutama melalui urin sebagian besar dalam bentuk obat utuh, sebagian besar sebagai konjugat lain. Pada

gagal ginjal, dosis normal pada isoniazid dapat diberikan biasanya, tetapi pada insufisiensi hepatis berat, dosisnya harus diturunkan (Katzung, 2010).

Penelitian sebelumnya telah menetapkan kadar isoniazid secara *in vitro* dengan menggunakan KCKT dan detektor UV pada KCKT. Fase gerak yang digunakan untuk penetapan kadar secara *in vitro* yaitu metanol dan air (Yustisia, 2015). Metode analisis yang digunakan untuk mengetahui perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo* harus menggunakan metode yang akurat, tepat, teliti dan memiliki kepekaan yang tinggi dan konsentrasi obat dalam plasma diukur mencapai level microgram sampai nanogram. Untuk itu, dapat digunakan metode KCKT karena salah satu keuntungan dari KCKT adalah dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (Johnson dan Stevenson, 1991).

KCKT adalah teknik pemisahan dengan fase gerak yang berupa zat cair dialirkan dengan cepat dengan bantuan tekanan dan hasilnya dideteksi dengan instrumen. Analisa dengan KCKT bertujuan untuk mendapatkan pemisahan yang baik dalam waktu relative cepat, daya pisahnya baik, peka, kolom dapat dipakai kembali dan ideal untuk molekul besar dan ion (Jhonson dan Stevenson, 1991).

F. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori diatas dapat dikemukakan suatu hipotesis bahwa perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* memberikan pengaruh terhadap kadar *in vivo*.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasma darah pasien tuberkulosis dengan pengobatan antituberkulosis fase lanjutan sesuai dengan kriteria inklusi dan ekslusi, plasma darah sehat. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah obat antituberkulosis (OAT) isoniazid.

1. Kriteria inklusi

- a. Diagnosa TB Non MDR
- b. Usia 17-60 tahun
- c. Mendapat pengobatan dengan obat antituberkulosis fase lanjut
- d. Merupakan pasien rawat jalan
- e. Berat badan 40-60 kg

2. Kriteria Ekslusi

- a. Pasien tuberkulosis dengan pengobatan tahap lanjut yang tidak rutin atau berhenti dalam terapi isoniazid
- b. Pasien yang menggundurkan diri selama mengikuti penelitian
- c. Pasien dengan penyakit komplikasi
- d. Pasien dengan usia diatas 65 tahun

3. Cara pengambilan sampel darah

Sampel yang akan diperiksa dalam penelitian ini merupakan plasma darah pasien tuberkulosis yang mendapat pengobatan antituberkulosis yang mengandung isoniazid dan rifampisin di wilayah puskesmas yang terdapat di Kabupaten X dan plasma darah sehat. Pasien yang diambil darahnya merupakan pasien yang telah menjalani pengobatan tuberkulosis pada tahap fase lanjutan. Pengambilan sampel langsung dilakukan ditempat yaitu puskesmas, setelah pasien meminum obat kemudian darahnya diambil 2 jam sesudah meminum obat tersebut.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah isoniazid. Variabel kedua dalam penelitian ini adalah perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama pertama, isoniazid adalah isoniazid merupakan salah satu obat antituberkulosis yang memiliki efek paling kuat terhadap *M. tuberculosis*. Variabel utama kedua, kadar isoniazid adalah perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo*.

Variabel utama ketiga, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi adalah KCKT Shimadzu model LC-10AS untuk menentukan kadar isoniazid. Variabel utama keempat, plasma penderita tuberkulosis.

Variabel utama yang telah 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 isoniazid.

Variabel tergantung yang dimaksud dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan, yaitu kadar isoniazid dengan pembeberian secara *in vitro* memberikan perbandingan terhadap kadar isoniazid secara *in vivo*.

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 keahlian peneliti, kemurnian bahan pembanding, kondisi laboratorium serta alat.

Variabel tidak terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang tidak dapat dikendalikan oleh peneliti sehingga dapat mempengaruhi hasil penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, isoniazid adalah merupakan salah satu obat antituberkulosis yang memiliki efek paling kuat terhadap *M. tuberculosis*. Kedua, perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* dan *in vivo*.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah (Shimadzu) terdiri dari pompa (LC-6 A), injektor (Shimpack[®] 5 µm; 250 x 4,6 mm), detektor UV (SPD-6A), dan pengolahan data pada computer CBM-102); spektrofotometer UV-Vis (Jasco); syringe (Hamilton); pH meter, timbangan analitik (merek AdventureTM Pro-OHAUS), penghilang gas, sentrifugator, alat vortex, mikropipet, alat-alat gelas, penyaring PTFE 0,2 µm.

2. Bahan

Isoniazid, aquabidestillata, asetonitril, kalium dihidrogen fosfat, plasma darah sehat, plasma darah pasien tuberkulosis, metanol, dan trietilamin (TEA).

D. Jalannya Penelitian

1. Larutan baku isoniazid.

Dibuat senyawa baku isoniazid ditimbang 7,5 mg kemudian dituang ke dalam labu ukur 25,0 mL dilarutkan dengan aquabidest, selanjutnya ditambahkan aquabidest sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan baku yang mengandung isoniazid dengan konsentrasi 300 µg/mL.

2. Penetapan panjang gelombang analisis.

Dibuat larutan induk dari konsentrasi 300 µg/mL isoniazid hingga diperoleh konsentrasi 10 µg/mL. Larutan tersebut dibuat kurva serapannya dan dicatat nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis. Nilai panjang gelombang dipilih untuk analisis.

3. Fase gerak untuk KCKT

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

Dicampurkan 990 ml larutan KH_2PO_4 10 mmol pH 6,2 yang diatur dengan trietilamin (TEA) dengan 10 mL asetonitril. Sebelum digunakan fase gerak dilakukan proses penghilangan gas.

3.2 Fase gerak larutan kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3). Larutan dicampur 970 mL larutan KH_2PO_4 10 mmol pH 6,2 yang diatur dengan trietilamin (TEA) dengan 30 mL asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak dilakukan proses penghilangan gas.

4. Optimasi kondisi analisis

4.1 Pemilihan kondisi analisis untuk isoniazid. Larutan isoniazid dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuntikan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (97:3) sebagai kondisi awal. Kemudian disuntikan 20,0 mL larutan pada alat KCKT dengan fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) sebagai kondisi awal.

Untuk pemilihan metode, laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Dicatat nilai N dari fase gerak yang pertama dan kedua.

4.2 Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis. Larutan yang mengandung isoniazid dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuntikan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Dicatat, kemudian dibandingkan waktu retensi yang diperoleh.

4.3 Pemilihan molaritas fase gerak untuk analisis. Fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) divariasikan molaritas kalium dihidrogen fosfat menjadi 5 mmol, 10 mmol, 15 mmol. Larutan yang mengandung isoniazid dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuntikan ke alat KCKT dengan masing-masing fase gerak yang memiliki molaritas kalium dihidrogen fosfat 5 mmol, 10 mmol, 15 mmol. Kemudian dicatat dan dibandingkan nilai N yang diperoleh.

5. Validasi metode

5.1 Pembuatan kurva baku dan uji linearitas. Dibuat larutan isoniazid dengan konsentrasi 2; 3; 4; 5; 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Lalu masing-masing sebanyak 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuntikan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Setelah itu dianalisis kedalam persamaan ($y = a + bx$) dari masing-masing konsentrasi dan dibuat kurva

kalibrasi dengan persamaan ($y = a + bx$). Kemudian dihitung koefisien korelasi (r) dari kurva tersebut.

5.2 Pengukuran batas deteksi limit (*Limit of Detection, LOD*) dan batas kuantitasi (*Limit of Quantification, LOQ*). Larutan isoniazid disiapkan pada konsentrasi 2; 3; 4; 5; 6 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Kemudian dihitung LOD dan LOQ ditentukan melalui kurva baku yang didapat. Nilai LOD setara dengan $3x(\text{Sy}/x)b$ sedangkan LOQ setara dengan $10x(\text{Sy}/x/b)$.

5.3 Uji akurasi dan perolehan kembali. Larutan isoniazid dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ dan tinggi 7 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Diulangi sebanyak tiga kali masing-masing konsentrasi dihitung nilai % *diff* dan % perolehan kembali (% *recovery*). Nilai % *diff* dipersyaratkan < 15% dan nilai % perolehan kembali disyaratkan berada pada rentang 80-125%.

5.4 Uji presisi. Larutan baku isoniazid dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ dan tinggi 7 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Diulangi sebanyak tiga kali masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung nilai RSD dengan rumus terlampir. Nilai RSD disyaratkan < 2% (Harmita,2004).

5.5 Uji interferensi hasil pengotor plasma. Darah diambil kemudian dimasukkan didalam tabung vacutainer yang berisi EDTA dan di sentrifuge dengan kecepatan 3600 rpm selama 15 menit, diambil bagian bening. Kemudian pada 500 μL plasma ditambahkan 500 $\mu\text{g/mL}$ asetonitril, dikocok dengan vortex selama 1 menit, kemudian disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Kemudian, diambil bagian beningnya dan disaring menggunakan saringan PTFE 0,2 μm dan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diamati puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu.

6. Penetapan kadar isoniazid pada plasma secara *in vitro*

Darah diambil kemudian dimasukkan didalam tabung vacutainer yang berisi EDTA dan di sentrifuge dengan kecepatan 3600 rpm selama 15 menit,

diambil bagian bening. Pada plasma 500 μL ditambahkan asetonitril 500 μL , kemudian ditambah isoniazid sebanyak 500 μL dan divortex. Disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit, diambil bagian bening. Disaring menggunakan saringan PTFE 0,2 μm . Sebanyak 20,0 μL disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih dan dilakukan replikasi 3 kali. Kemudian dianalisis menggunakan persamaan ($y = a+bx$).

7. Pengambilan sampel

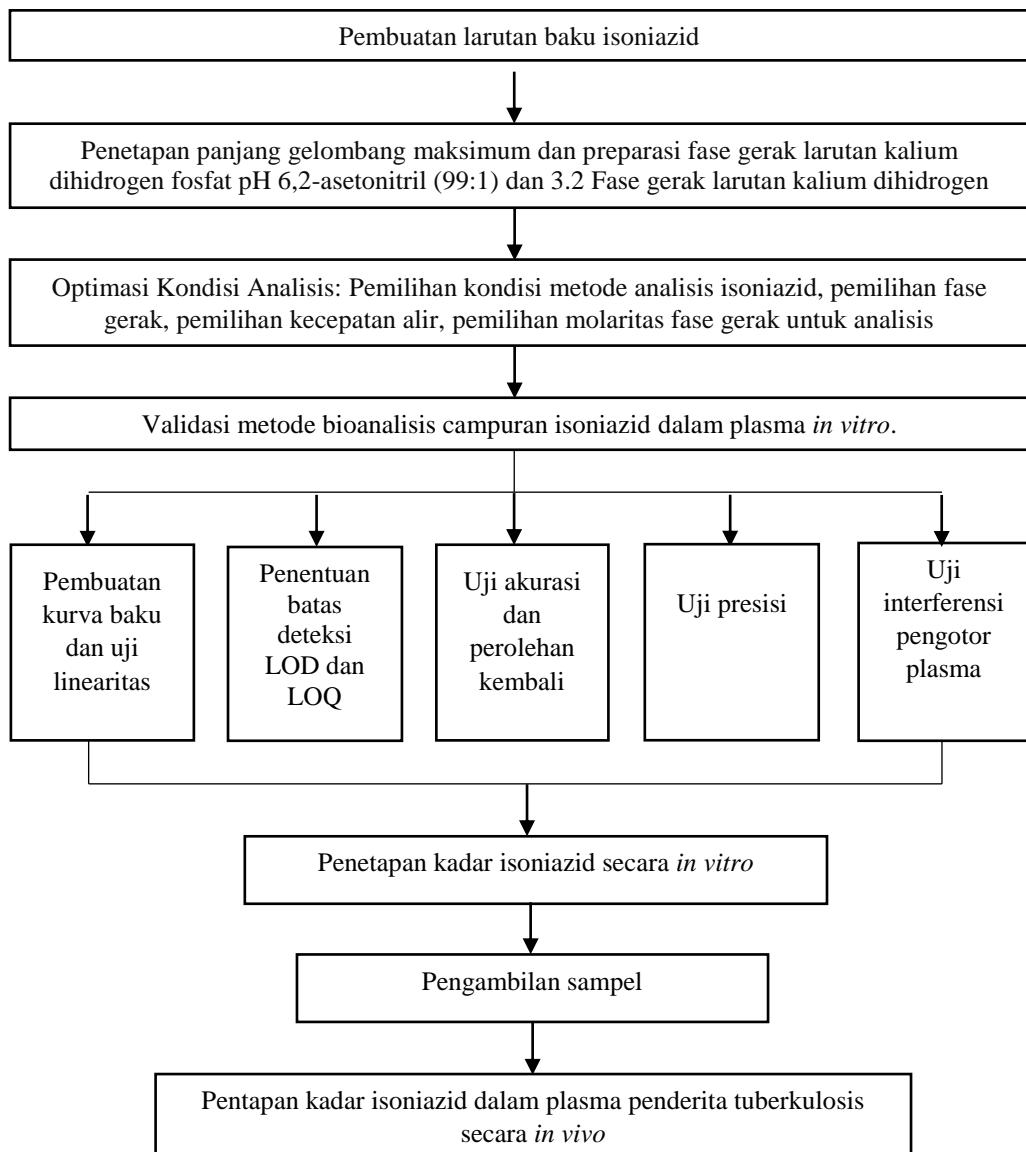
Sampel yang akan diperiksa dalam penelitian ini merupakan plasma darah pasien tuberkulosis yang mendapat pengobatan antituberkulosis fase lanjut di wilayah puskesmas Kabupaten X dan plasma darah sehat. Pasien yang diambil darahnya merupakan pasien yang telah menjalani pengobatan tuberkulosis pada tahap fase lanjutan. Pengambilan sampel langsung dilakukan ditempat yaitu puskesmas, setelah pasien meminum obat kemudian darahnya diambil 2 jam sesudah meminum obat tersebut. Sampel darah yang telah diambil dimasukkan kedalam vacutainer yang berisi EDTA sebanyak 3 mL, kemudian disentrifuge 3600 rpm selama 15 menit dan diambil bagian beningannya.

8. Penetapan kadar isoniazid dalam plasma penderita tuberkulosis secara *in vivo*.

Diambil 200 μL plasma darah penderita TB, kemudian ditambahkan asetonitril 200 μL dikocok dengan vortex dan disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit. Diambil bagian beningnya kemudian disaring dengan menggunakan saringan PTFE 0,2 μm . Sebanyak 20,0 μL disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih dan dilakukan replikasi 3 kali. Kemudian dianalisis menggunakan persamaan ($y = a+bx$).

E. Analisa Data

Dari hasil data yang diperoleh dilanjutkan analisa menggunakan metode *Paired samples t-test*.



Gambar 3. Skema jalannya penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang dimana zat aktif menghasilkan absorbansi paling maksimal. Panjang gelombang diukur secara scanning pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi larutan yang digunakan untuk isoniazid 10 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian ditentukan panjang gelombang yang terpilih untuk isoniazid adalah 230 nm. Hasil pemilihan panjang gelombang isoniazid dapat dilihat pada lampiran 8.

2. Optimasi kondisi analisis

2.1 Penetapan metode analisis isoniazid. Penetapan kadar isoniazid dalam darah *in vitro* dilakukan pada kondisi optimum dengan kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom C18 dengan kecepatan alir 1 mL/menit, panjang gelombang 230 nm, dengan volume disuntikan sebanyak 20 μl . Komposisi fase gerak semula terdiri dari kalium dihidrogen fosfat pH 6,2-asetonitril (99:1) 10 mmol. Kemudian dilakukan modifikasi fase gerak yaitu komposisi kedua kalium dihidrogen fofat 10 mmol pH 6,2-asetonitril (97:3) dengan laju alir yang digunakan 1 mL/menit. Namun hasil optimasi ini memberikan data kromatogram dengan nilai N yang lebih kecil daripada komposisi kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2-asetonitril (99:1). Data hasil optimasi dapat dilihat pada lampiran 22.

Tabel 1. Nilai N penetapan metode analisis isoniazid

	Fase gerak kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2-asetonitril (97:3)	Fase gerak kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2-asetonitril (99:1)
N	15424,801	18573,901
	15586,571	18036,908
	15281,044	18622,954

2.2 Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis. Pemilihan kecepatan alir untuk fase gerak terpilih dengan laju alir 0,8 mL/menit dengan

waktu retensi 8,787 menit, 1 mL/menit memberikan data waktu retensi 6,892 menit, dan dengan laju alir 1,2 mL/menit diperoleh waktu retensi 5,875 menit.

2.3 Pemilihan molaritas fase gerak untuk analisis. Kemudian dilakukan modifikasi lagi dengan perubahan molaritas dengan komposisi kalium dihidrogen fosfat 5 mmol pH 6,2 -asetonitril (99:1), kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6,2 –asetonitril (99:1) dan kalium dihidrogen fosfat 15 mmol pH 6,2-asetonitril (99:1) masing-masing komposisi tersebut dengan laju alir 1 mL/menit. Fase gerak dengan komposisi kalium dihidrogen fosfat 15 mmol pH 6,2-asetonitril (99:1), metode ini dipilih karena menghasilkan nilai N yaitu 29889,105; 28180,663; 28341,875, nilai N yang diperoleh lebih banyak daripada komposisi fase gerak yang lain. Hasil data pemilihan molaritas fase gerak untuk analisis dapat dilihat pada lampiran 22.

Tabel 2. Nilai N molaritas fase gerak untuk analisis

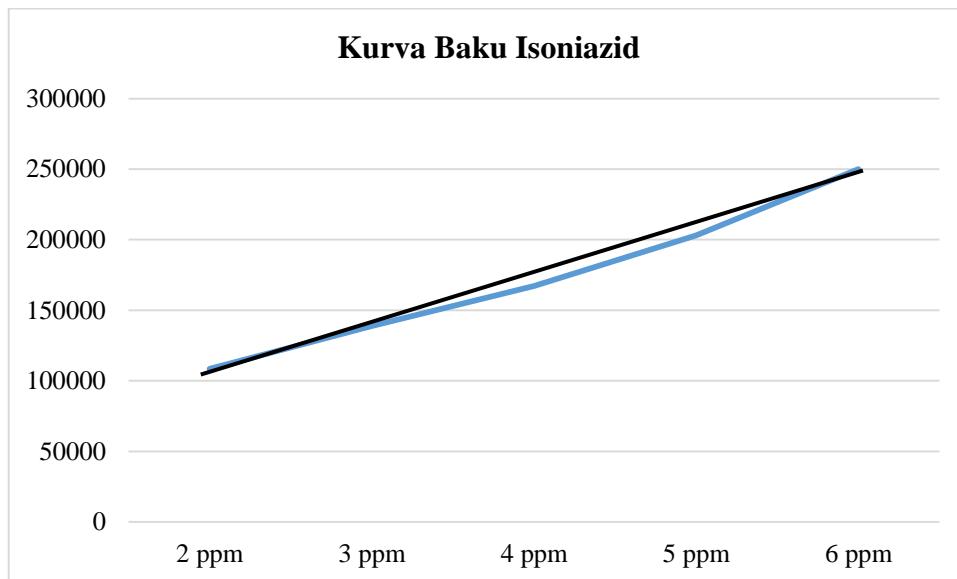
Molaritas	N
5 mmol	27016,651
	27097,763
	28196,501
10 mmol	27265,233
	27029,198
15 mmol	29889,105
	28180,663
	28341,875

3. Validasi Metode

3.1 Persamaan kurva baku dan uji linearitas. Kurva baku isoniazid dibuat dengan seri kadar 2; 3; 4; 5; 6 $\mu\text{g/mL}$ dan diperoleh persamaan $Y = 34582,27 + 34740,43x$ dengan $r = 0,994$, dimana X adalah kadar isoniazid dan Y adalah perbandingan luas kromatogram. Data persamaan kurva baku dan uji linearitas dapat dilihat dilihat pada tabel 3 dan gambar 4.

Tabel 3. Persamaan kurva baku

Konsentrasi (ppm)	Luas Area
2 ppm	108434,7
3 ppm	138904,3
4 ppm	167309,7
5 ppm	202964,7
6 ppm	250106,7



Gambar 4. Kurva baku isoniazid

3.2 Batas deteksi LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantitation*). Melihat kadar terkecil dalam analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan dan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama, maka dilakukan perhitungan batas deteksi dan batas kuantifikasi (Errner, J dan Miller 2005). Hasil dari kurva baku isoniazid didapatkan *LOD* dan *LOQ* yaitu 0,582 dan 1,941. Data mengenai uji *LOD* dan *LOQ* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Data *LOD* dan *LOQ*

Nama sampel isoniazid	Nilai
<i>LOD (Limit of Detection)</i>	0,582
<i>LOQ (Limit of Quantitation)</i>	1,941

3.3 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 persentase perolehan kembali. Persyaratan perolehan kembali untuk sampel dengan konsentrasi 100 µg/mL- 10 µg/mL adalah 80-110% (Huber, 2007).

Secara berurutan, untuk konsentrasi 1 µg/mL, 4 µg/mL dan 7 µg/mL diperoleh nilai % perolehan kembali sebesar 114%, 97, 575%, 112,5%. Jika hasil yang diperoleh dibandingkan dengan persyaratan yang ditentukan yaitu 80-120%, maka dapat disimpulkan bahwa metode telah memenuhi persyaratan uji akurasi dan perolehan kembali. Hasil uji akurasi dan perolehan kembali dapat dilihat pada tabel 5 dan lampiran 28.

Tabel 5. Hasil uji akurasi dan perolehan kembali

Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi terukur (µg/mL)	Rata-rata konsentrasi Terukur (µg/mL)	% Recovery
1	1,165	1,140	114,000
	1,114		
	1,140		
4	3,878	3,903	97,575
	3,856		
	3,975		
7	7,825	7,875	112,500
	7,910		
	7,892		

3.4 Uji presisi. 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 µg/mL, 4 µg/mL dan 7 µg/mL, isoniazid diinjeksikan sebanyak 3 kali pada hari yang sama lalu dihitung %RSD dari hasil yang diperoleh. Menurut AOAC, kriteria seksama diberikan jika memberikan nilai standar deviasi relative yaitu 2-5% dari hasil yang diperoleh. Dapat disimpulkan bahwa metode yang dilakukan mempunyai presisi yang baik karena berada pada kriteria yang diberikan. Data hasil uji presisi dapat dilihat pada tabel 6 dan lampiran 29.

Tabel 6. Hasil uji presisi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	SD	%RSD
1	1,165	1,140	0,026	2,281
	1,114			
	1,140			
4	3,878	3,903	0,063	1,614
	3,856			
	3,975			
7	7,825	7,875	0,045	0,571
	7,910			
	7,892			

3.5 Uji interferensi pengotor plasma. Pada uji ini, dilakukan pengendapan protein ini bertujuan untuk menghilangkan komponen-komponen yang ada dalam protein plasma yang dapat menganggu analisis dan kromatogram. Hasil yang didapatkan dari pelarut organik yang digunakan adalah asetonitril dengan perbandingan 1:1 (*v/v*) dengan plasma darah. Gambar hasil uji interferensi pengotor plasma dapat dilihat pada lampiran 23.

4. Penetapan kadar isoniazid secara *in vitro*

Dari hasil kromatogram yang diperoleh didapatkan luas area kemudian dimasukkan kedalam persamaan $Y=34582,27 + 34740,43x$. Sehingga diperoleh kadar isoniazid 8,525 $\mu\text{g/mL}$. Hasil data penetapan kadar secara *in vitro* dapat dilihat pada lampiran 31.

Tabel 7. Penetapan kadar isoniazid secara *in vitro*

Percobaan	Kadar terukur (ppm)
1	7,789
2	8,524
3	9,261
Rata-rata	8,525

5. Penetapan kadar isoniazid secara *in vivo*.

Pada penetapan kadar, plasma darah penderita TB diperoleh luas area dari kromatogram, kemudian dimasukkan kedalam persamaan $Y=34582,27 +$

34740,43x. Sehingga hasil kadar isoniazid secara *in vivo* 5,091 µg/mL. Hasil data penetapan kadar secara *in vivo* dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Penetapan kadar secara *in vivo*

Percobaan	Kadar terukur (ppm)
1	6,808
2	4,830
3	3,635
Rata-rata	5,091
%Kadar	101,82

Penetapan kadar secara *in vitro* dan *in vivo* dilakukan pada hari yang berbeda. Hasil yang diperoleh pada penetapan kadar secara *in vitro* yaitu 8,525 µg/mL dan *in vivo* diperoleh hasil 5,091 µg/mL, % kadar secara *in vivo* diperoleh 101,82%, kadar isoniazid melebihi kadar puncak dalam plasma karena terjadinya akumulasi isoniazid akibat penggunaan isoniazid pada pasien tuberkulosis dalam jangka panjang. Pada perlakuan secara *in vivo*, isoniazid diserap dengan baik dalam gastrointestinal setelah pemberian per oral dan distribusikan keseluruhan tubuh. Makanan ataupun antasida dapat menurunkan bioavabilitasnya. Kadar puncak dalam plasma tercapai dalam waktu 1-2 jam setelah pemberian per oral. Didalam tubuh isoniazid terikat pada protein plasma < 10% (Muzaijadah, 2010).

Sebelum mencapai sirkulasi sistemik isoniazid mengalami metabolisme lintas awal (*first pass metabolism*) dihati dan terjadi pengurangan bioavabilitasnya (Sweetman, 2009). Isoniazid di dalam tubuh mengalami proses asetilasi menjadi asetil isoniazid dan proses hidrolisis yang dihidrolisa menjadi asam nikotinat (Tjay dan Rahardja, 2002). Sekitar 75%-95% dari isoniazid diekskrekikan melalui ginjal dalam 24 jam pertama, terutama sebagai metabolit berbentuk asetil isoniazid dan asam nikotinat (Teixeira *et al*, 2013)

Hasil uji *Paired samples t-test* untuk perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo* diperoleh nilai sig > 0,05 menunjukkan tidak terdapat perbedaan dari kedua perlakuan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukan bahwa perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo* diperoleh kadar *in vitro* yaitu 8,525 µg/mL dan kadar *in vivo* yaitu 5,091 µg/mL.

B. Saran

1. Perlu dilakukan uji dengan larutan pengendap protein yang lain.
2. Perlu dilakukan uji *in vitro* dan *in vivo* pada hari yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- [Anonim]. 1979. *Farmakope Indonesia. Edisi III.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Anonim]. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Anonim]. 2003. *Laporan Parktikum Penentuan Kadar Air.* <http://www.scribed.com/doc/14098051/Laporan-praktikum-penentuan-kadarair>. Diakses tanggal 23 September 2016.
- Bertram G.Katzung. *Farmakologi dasar dan klinik.* 10th ed. Jakarta. EGC; 2010.p479-489.
- [Depkes RI]. 2007. *Pedoman Penyakit Tuberkulosis dan Penanggulangannya,* cetakan I. Direktorat Jendral Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman [Skripsi]. Jakarta 21-46
- Food and Drug Administration (FDA), 2013. *Guidance for industry photosafety testing, pharmacology toxicology coordinating committee in the centere for drug evaluation and reseach (CDER) at the FDA*
- Gandjar, L.G., and Rohman, A. 2013. *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi.* Pustaka Pelajar. Yogyakarta. Indonesia.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M dan Swharting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi.* Edisi Kedua. Penerbit ITB. Bandung
- Goodman & Gilman. 2008. *Dasar Farmakologi Terapi.* Edisi 10. Penerbit buku Kedokteran.
- Fatayah N.U. 2012. *Hepatoprotektor.* Jakarta
- Hadjar, M. M. (1985), Teknik Analisis Obat Dalam Cairan Biologis Dengan GLC dan HPLC. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran.* Volume I (3): 129.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah ilmu kefarmasian.* 1(3), 117-135.
- Hendayana S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektrofrlorensis Modern.* Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Huber, Diane L. (2007). *Leadership and Nurising Management Care.* Phyadelphia: Saunders Elsevier
- Istiantoro, Y.H. dan Setiabudy. R., 2007, Tuberkulosis. *Farmakologi dan terapi* (Edisi V). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI.
- Jhonson El, Stevenson R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair.* Padmainata, Penerjemah ; Bandung: ITB.

- Kelly, M.T. 1992. *Drug Analysis in Biological Fluids*. Dalam: Chemical Analysis in Complex Matrices. New York: Ellis Horwood.
- Katzung G Bertram. 1998. *Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi IV*. Penerjemah; Jakarta: Penerbit EGC Buku Kedokteran, (alih Bahasa Staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.
- Katzung, B.G. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik Edisi XIII*. Diterjemahkan oleh staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran UNAIR. Jakarta: Penerbit Salemba Empat. hlm 67-105.
- Mulja, M., Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Mutschler, E. 1999. *Dinamika Obat*. Edisi V. Bandung: Penerbit ITB
- Muzaijannah RA. 2010. Tingkat Konsentrasi Dalam Plasma Antara Isoniazid Generik Dibandingkan Isoniazid Non-Generik
- Shargel L, Yu. 1998. *Biofarmasetika dan Farmakokinetika*. Edisi I & II. Surabaya: Airlangga Universitas Press.
- Shargel L, Yu. 2005. Biofarmasetika dan Farmakokinetika. Edisi IV. Surabaya : Airlangga Universitas Press.
- Siswandono dan Soekarjo, B. (2000). *Kimia Medisinal*. Edisi III. Surabaya: Airlangga University Press. Hal. 127, 130, 300, 303
- Soetarno. 2009. *Farmakokinetika*. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi. Hal 1-70.
- 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 Dapertemen Farmasi Universitas Indonesia.
- Stockley,I.H. (2008). Stockley's *Drug Interaction*. Edisi kedelapan. Great Britain : Pharmaceutical Press. Halaman 1-9.
- Sweetman, S. C. 2009. *Martindale. The Complete Drug Reference*. 36th ed. Pharmaceutical Press. London.
- Tan Hoan Tjay dan Kirana R. 2007. *Obat-obat Penting Edisi ke-6*. Depatemen Kesehatan RI.
- Teixeira, R. L. F., M. Q. P. Lopes, . N. Suffys dan A.R Santos. 2013. *Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art*. <http://dx.doi.org/10.5772/54984>. 23 Oktober 2013.
- Tjay TH., Rahardja, K. (2002), Tuberkulostatika dalam *Obat-obat Penting*. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo
- Tjay TH, Rahardja K. 2007. *Obat-obat Penting*. Jakarta : PT. Gramedia.

Yustia D.K. 2014. Pengaruh Pemberian Tablet Curcuma Terhadap Kadar Rifampisin dan Isoniazid Secara In Vitro Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Surakarta : Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

$$\mathcal{L}$$

$${\mathcal A}$$

$$\mathcal{M}$$

$$\mathcal{P}$$

$$I$$

$$\mathcal{R}$$

$${\mathcal A}$$

$$\mathcal{N}$$

Lampiran 1. Surat kelaikan etik


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


ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 108 / II / HREC /2017

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

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

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

PERBANDINGAN KADAR ISONIAZID DAN RIFAMPISIN SECARA IN VITRO TERHADAP
KADAR IN VIVO

<i>Principal investigator</i> Peneliti Utama	:	Dewi Oktavia Carolina Tubun 19133760A
<i>Location of research</i> Lokasi Tempat Penelitian		

Is ethically approved
Dinyatakan laik etik

Issued on : 20 Februari 2017


Chairman
Ketua

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

Lampiran 2. Sertifikat analisis isoniazid

INDOFARMA

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

Nama bahan	ISONIAZID, Working Standard		
No. kontrol	16032F13		
Tanggal pelulusan	18 Mei 2016		
Retest	Mei 2017		
Penyimpanan	Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya, suhu 25°C (suhu yang penyimpanan yang diperbolehkan 15–30°C)		
Reference standard	USP Isoniazide R5, Lot 106205		
Parameter Pengujian	Satuan	Hasil	Persyaratan
Pemeriksaan	-	Sesuai	Serbuk halur 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 pemurnian	%	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

R. H. Fitra Hini, S.Si, Apt.
Fitra Hini, S.Si, Apt.
Fit Manager Pengawasan Mutu

PT. INDOFARMA Tbk
Commercial Office
Jl. Taman No. 2, Manggarai, Jakarta 13120
Phone : (021) 83302500
Fax : (021) 8334503
Head Office/Factory
Jl. Indofarma No.1, Cilawang Barat, 17530, Jawa Barat, PO Box 4111/007 10041, Indonesia
Phone : (021) 88332971, 88333375
Fax : (021) 88312972/73
http://www.indofarma.co.id

Lampiran 3. Foto alat PHmeter dan alat KCKT

Alat PHmeter



Alat KCKT



Lampiran 4. Foto syringe 20 μL dan ultrasonic cleanerSyringe 20 μL 

Ultrasonic cleaner



Lampiran 5. Foto alat sentrifugasi dan membran whatman 0.45 µm

Sentrifugasi



Membran Whatman 0.45 µm



Lampiran 6. Foto timbangan analitik dan alat vortex

Timbangan



Alat vortex



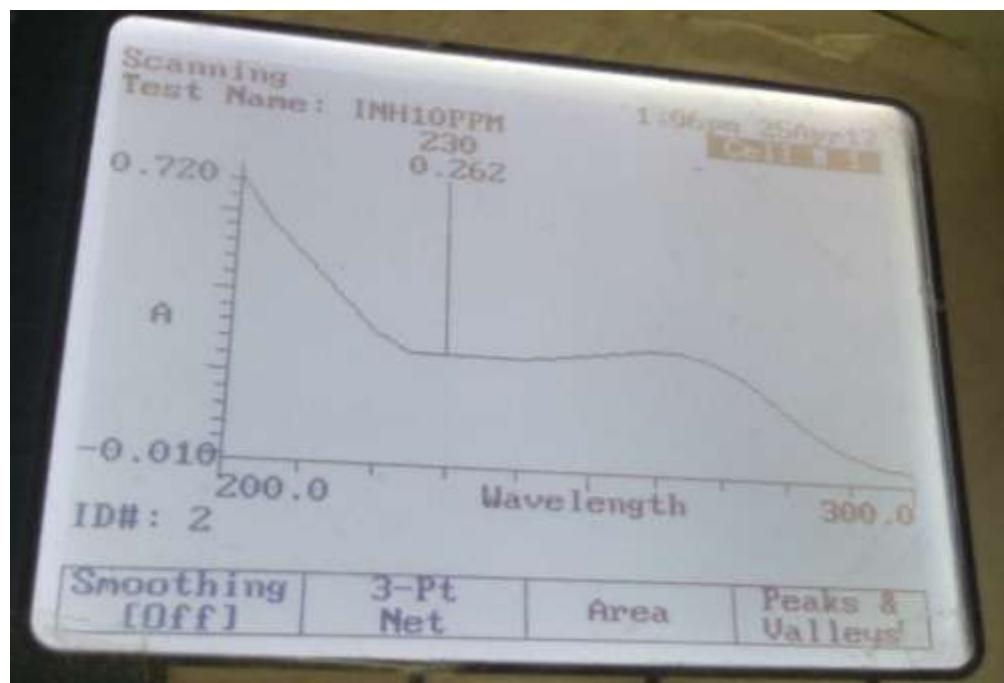
Lampiran 7. Foto mikropipet

Mikropipet



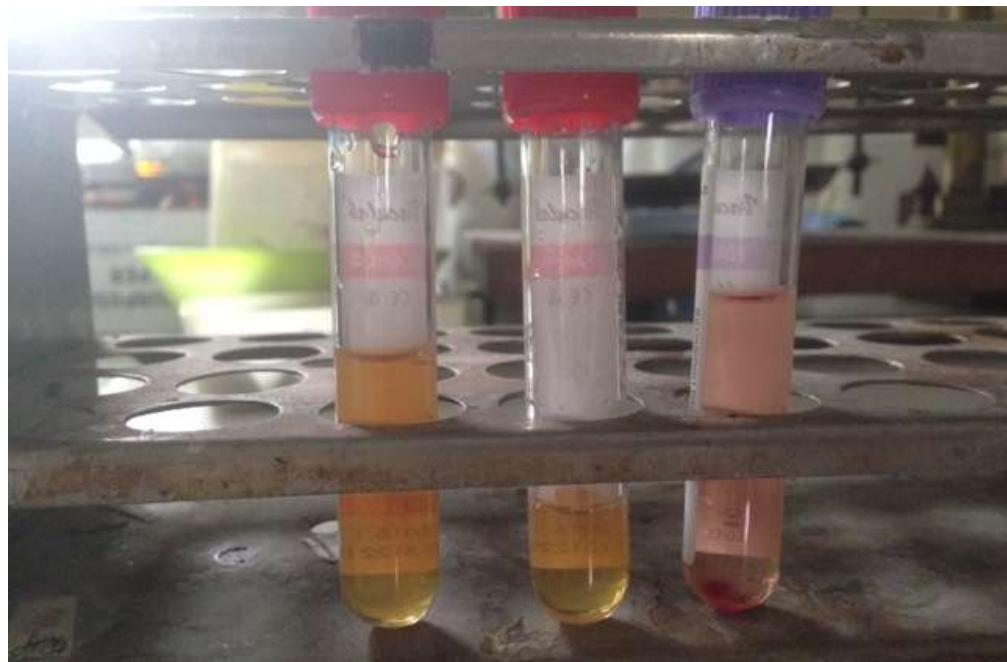
Lampiran 8. Foto pemilihan panjang gelombang isoniazid menggunakan spektroskopi UV-Vis

Pemilihan panjang gelombang isoniazid menggunakan spektroskopi UV-Vis



Lampiran 9. Plasma darah sehat dan plasma pasien tuberkulosis

Plasma darah sehat



Plasma darah pasien tuberkulosis

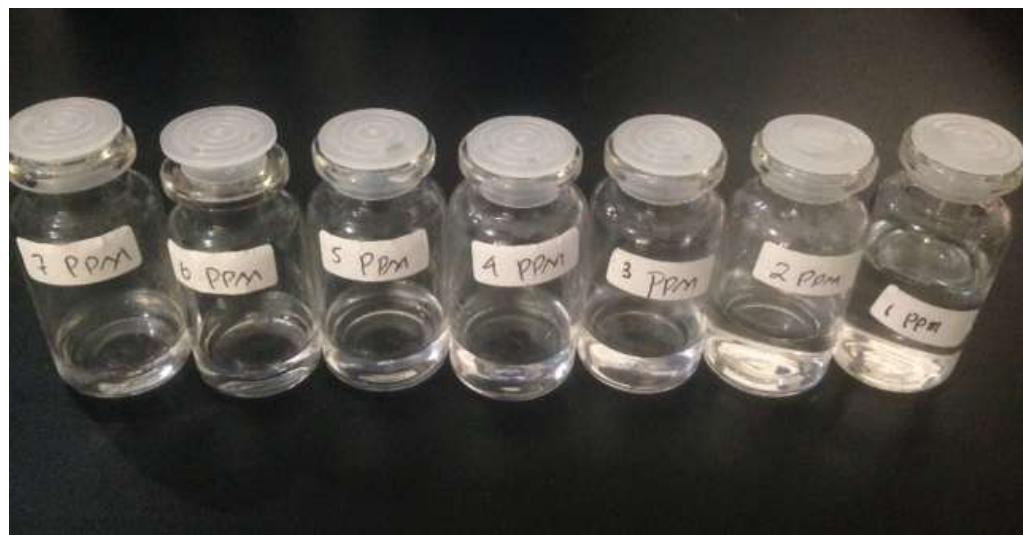


Lampiran 10. Foto analisis sampel pasien tuberkulosis
Analisis sampel pasien tuberkulosis



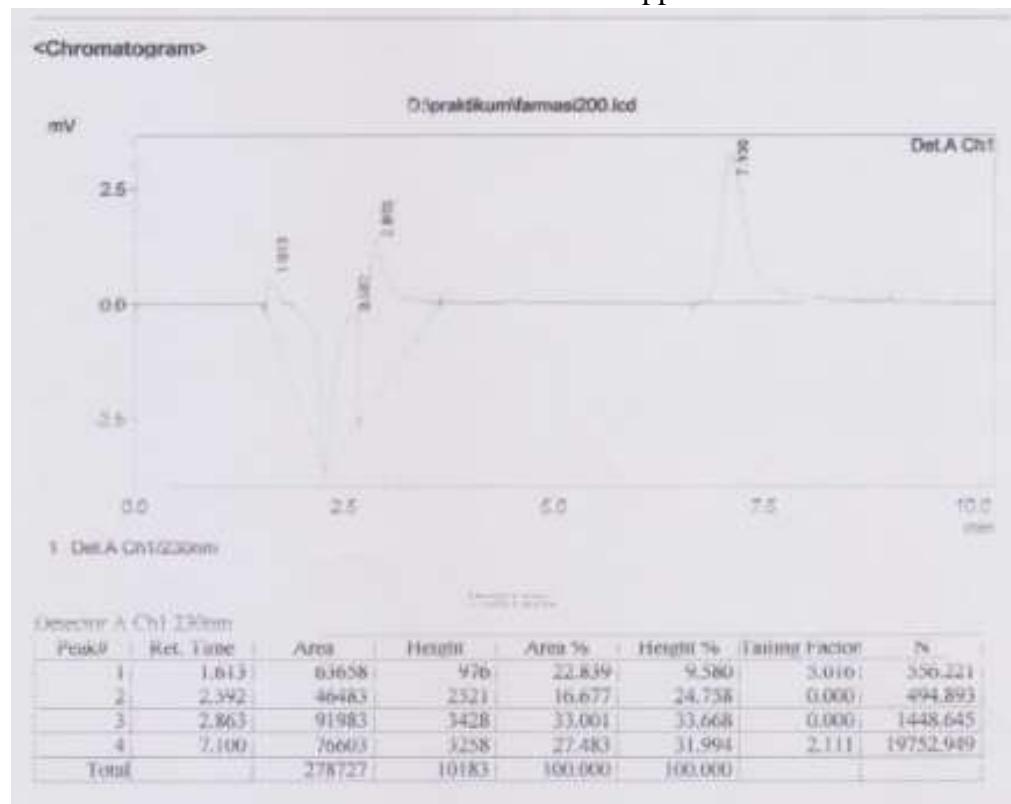
Lampiran 11. Foto kurva baku isoniazid

Kurva baku isoniazid



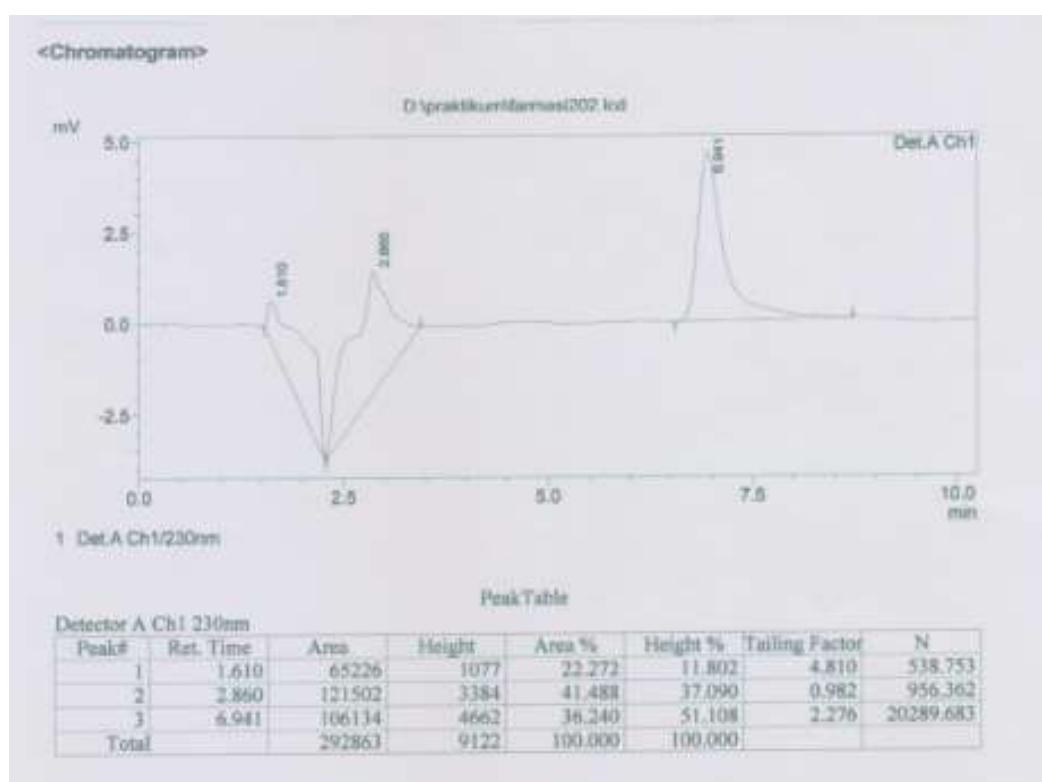
Lampiran 12. Kurva baku isoniazid 1 ppm

Kurva baku isoniazid 1 ppm



Lampiran 13. Kurva baku isoniazid 2 ppm

Kurva baku isoniazid 2 ppm



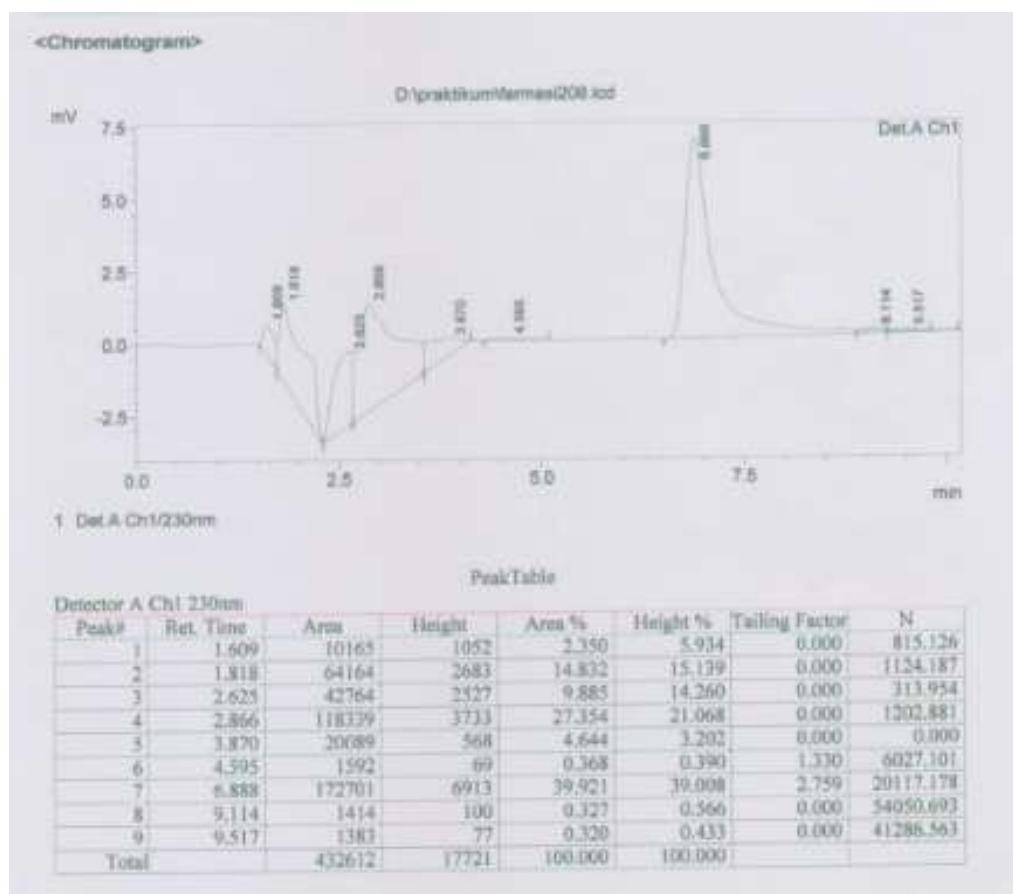
Lampiran 14. Kurva baku isoniazid 3 ppm

Kurva baku isoniazid 3 ppm



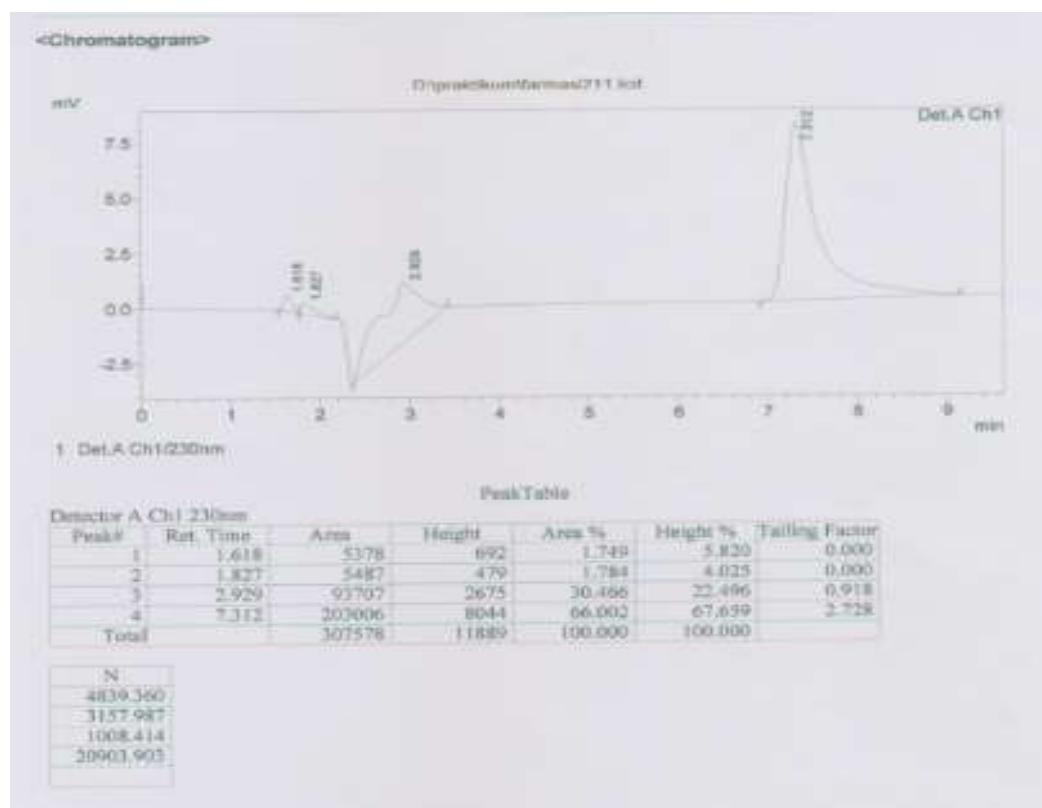
Lampiran 15. Kurva baku isoniazid 4 ppm

Kurva baku isoniazid 4 ppm



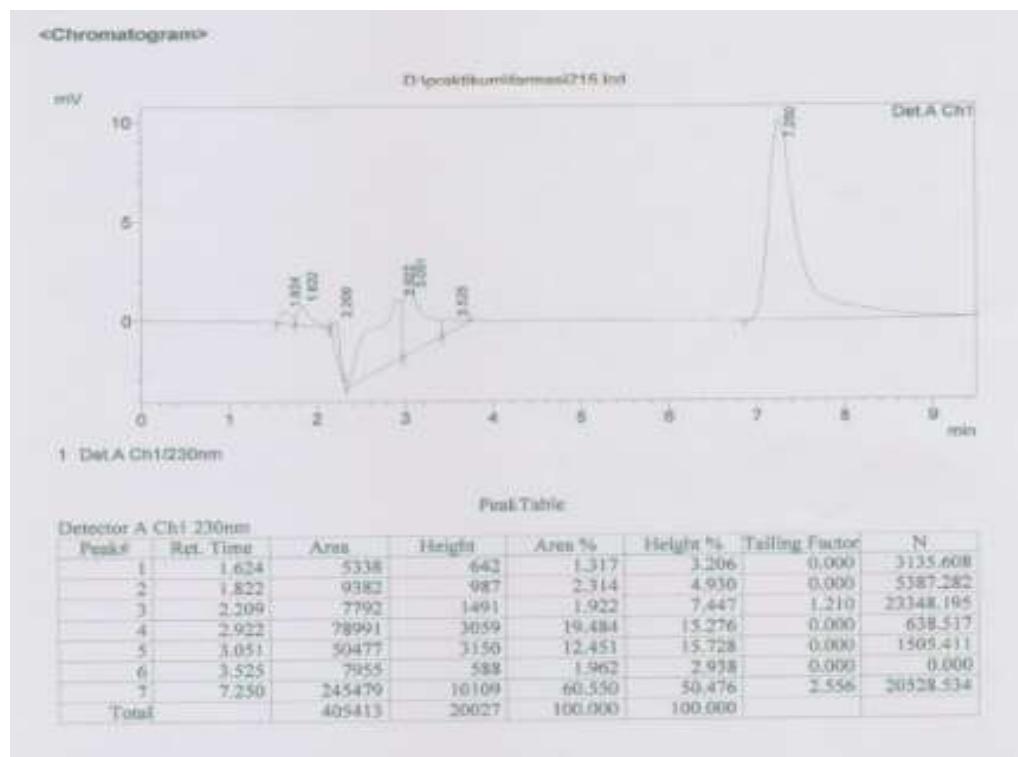
Lampiran 16. Kurva baku isoniazid 5 ppm

Kurva baku isoniazid 5 ppm



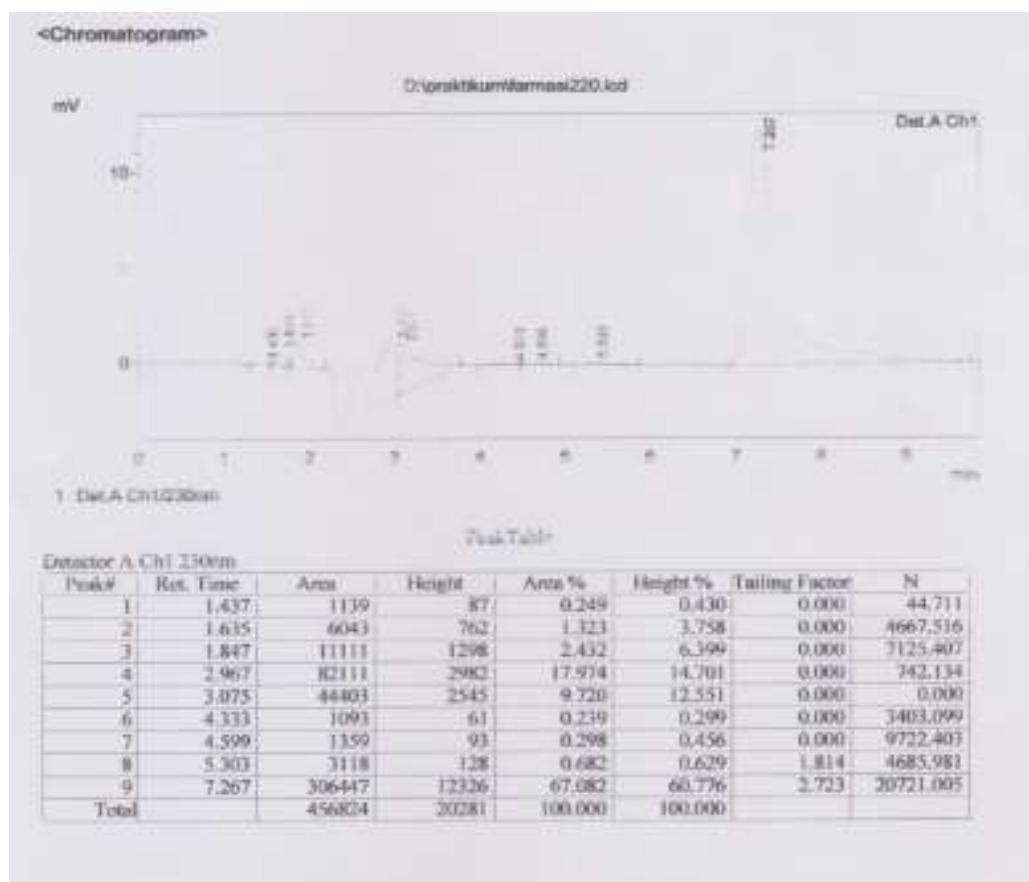
Lampiran 17. Kurva baku isoniazid 6 ppm

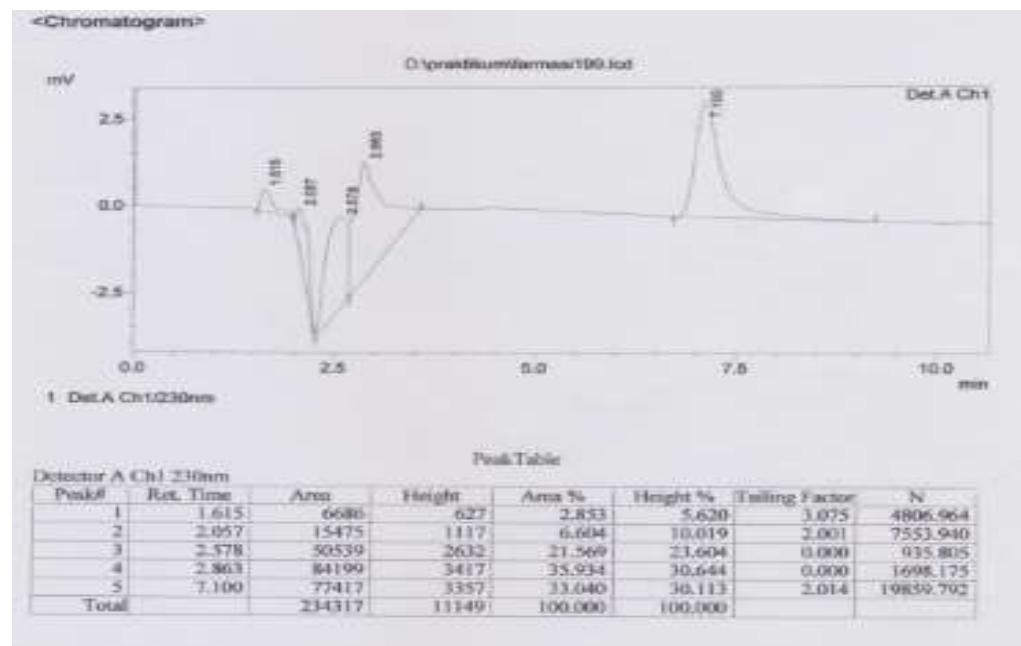
Kurva baku isoniazid 6 ppm



Lampiran 18. Kurva baku isoniazid 7 ppm

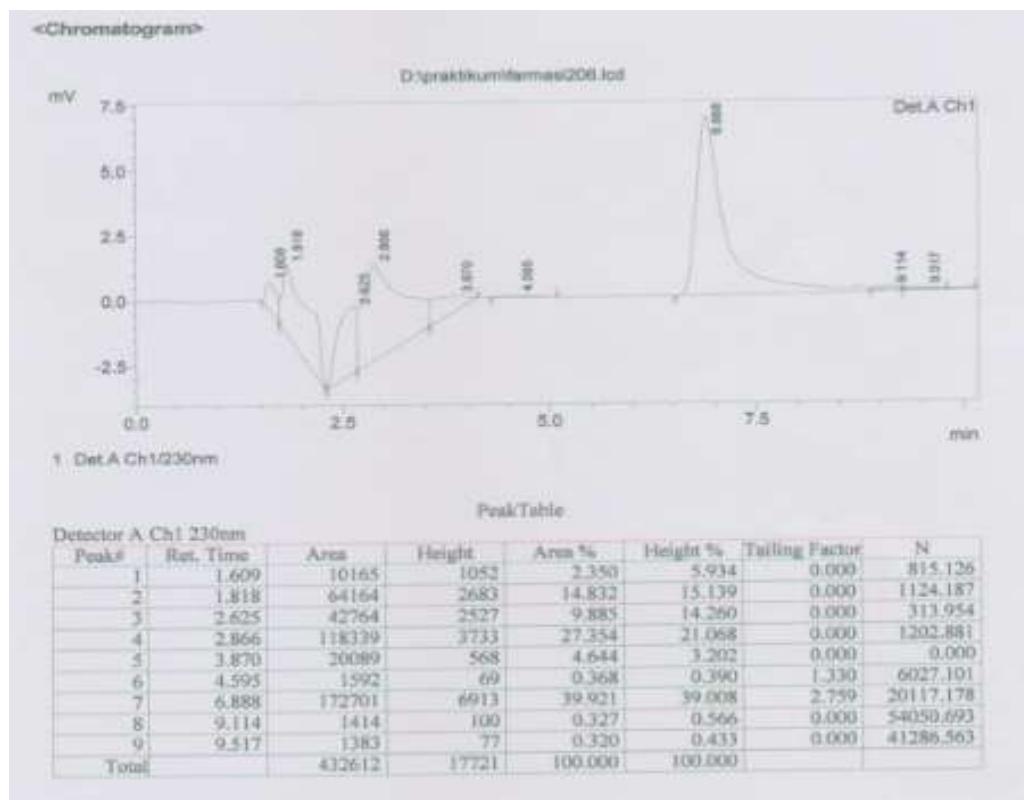
Kurva baku isoniazid 7 ppm



Lampiran 19. Kromatogram presisi 1 ppm**Kromatogram presisi 1 ppm**

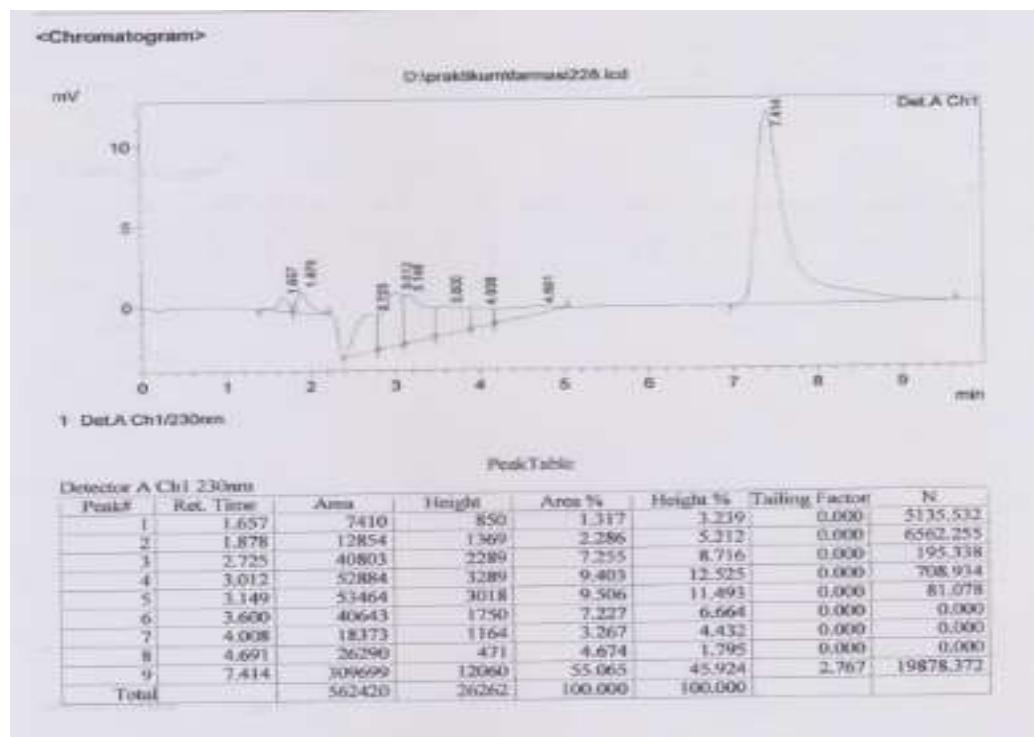
Lampiran 20. Kromatogram uji presisi 4 ppm

Kromatogram uji presisi 4 ppm



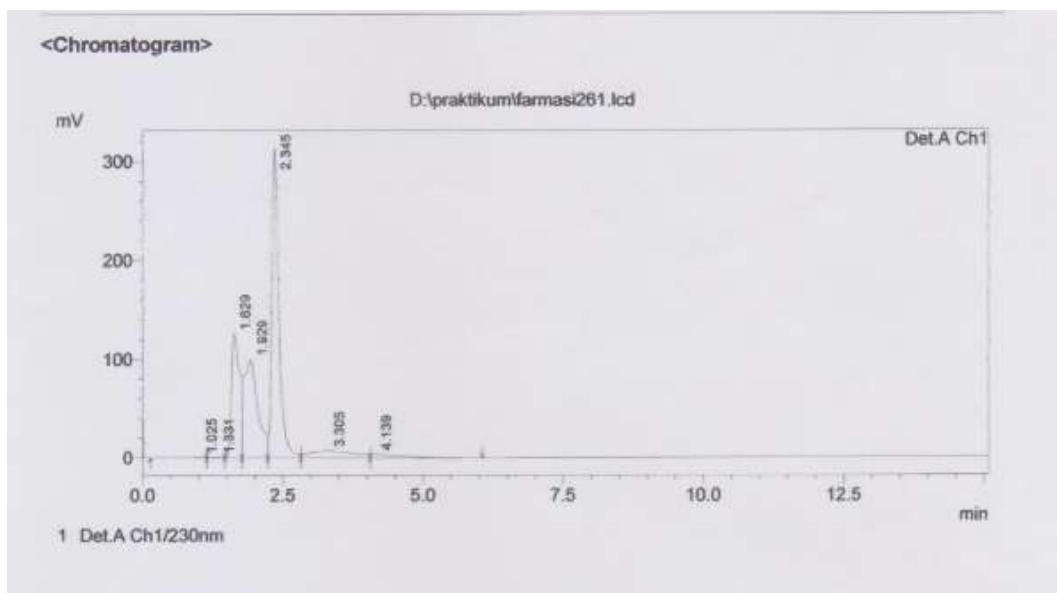
Lampiran 21. Kromatogram uji presisi 7 ppm

Kromatogram uji presisi 7 ppm



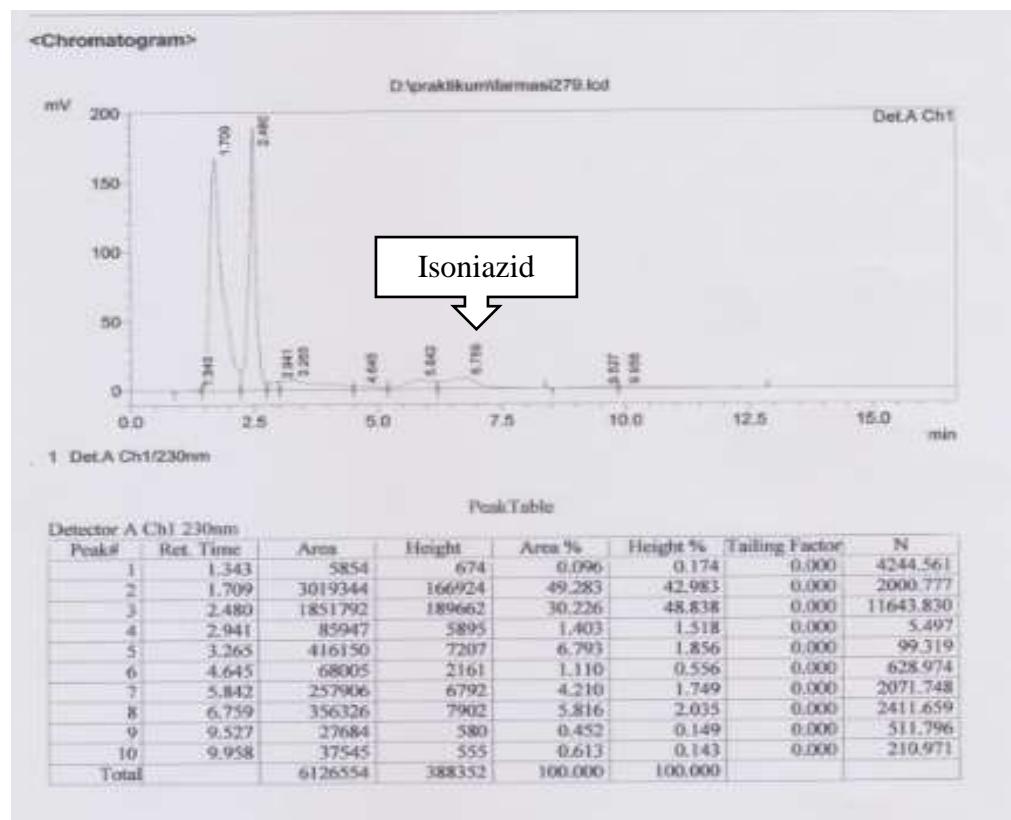
Lampiran 22. Kromatogram uji interferensi pengotor plasma

Kromatogram uji interferensi pengotor plasma



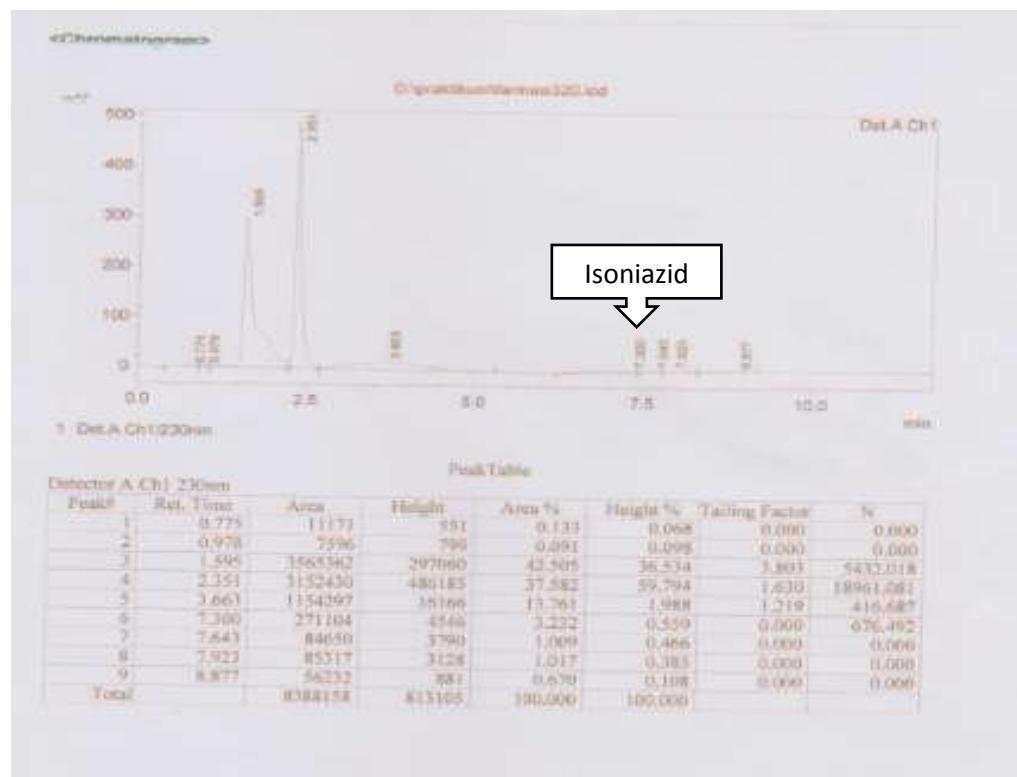
Lampiran 23. Kromatogram isoniazid dalam plasma darah secara *in vitro*

Kromatogram isoniazid dalam plasma darah secara *in vitro*



Lampiran 24. Kromatogram penyuntikan sampel plasma pasien TB

Kromatogram penyuntikan sampel plasma pasien TB



Lampiran 25. Optimasi Kondisi analisis

a. Fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6.2 – asetonitril (99:1)

No.	N	HETP	Tf
1.	18573.901	0.000807	2.060
2.	18036.908	0.000831	1.952
3.	18622.954	0.000805	2.029

b. Fase gerak kalium dihidrogen fosfat pH 6.2 – asetonitril (97:3)

No.	N	HETP	Tf
1.	15424.801	0.000972	1.680
2.	15586.571	0.000962	1.673
3.	15281.044	0.000981	1.569

c. Molaritas fase gerak kalium dihidrogen fosfat 5 mmol pH 6.2 - asetonitril (99:1)

N	HETP	Tf
27016,651	0,000555	3,314
27097,763	0,000553	3,210
28196,501	0,000531	3,181

d. Molaritas fase gerak kalium dihidrogen fosfat 10 mmol pH 6.2 - asetonitril (99:1)

N	HETP	Tf
27265,233	0,000550	3,247
2709,198	0,000553	3,617

e. Molaritas fase gerak kalium dihidrogen fosfat 15 mmol pH 6.2 - asetonitril (99:1)

N	HETP	Tf
29889,105	0,000515	3,125
28180,663	0,000532	3,322
28341,875	0,000529	3,090

Lampiran 26. Kurva Baku

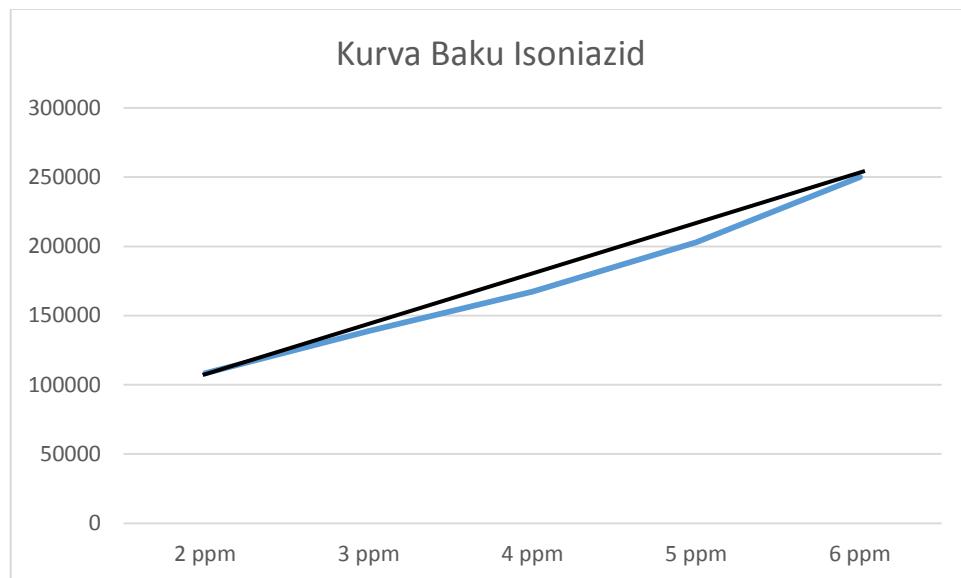
Konsentrasi (ppm)	Luas Area
2 ppm	108434,7
3 ppm	138904,3
4 ppm	167309,7
5 ppm	202964,7
6 ppm	250106,7

Regresi Linear Konsentrasi dengan Luas area

$$a = 34582,27 \quad Y = a+bx$$

$$b = 34740,43 \quad Y = 34582,27 + 34740,43x$$

$$r = 0,994$$



Lampiran 27. LOD dan LOQ

Konsentrasi (ppm)	Y	Y'	(Y-Y')	(Y-Y') ²
2	108434,7	104063.13	4371.53	19110274,54
3	138904,3	138803.57	100.77	10154,5929
4	167309,7	173544.00	-6234.33	38866870,55
5	202964,7	208284.43	-5319.77	28299952,85
6	250106,7	243024.87	7081.80	50151891,24
				$\Sigma = 136439143,8$

a. $S_n = \frac{\sum(Y-Y')^2}{n-2} = \frac{136439143,8}{5-2} = 45479714,6$

b. $S = \sqrt{S_n} = \sqrt{45479714,6} = 6743,86496$

c. $LOD = 3 \times \frac{s}{b} = 3 \times \frac{6743,86496}{34740,43} = 0,582$

d. $LOQ = 10 \times \frac{s}{b} = 10 \times \frac{6743,86496}{34740,43} = 1,941$

Lampiran 28. Data hasil uji akurasi dan perolehan kembali

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Area terukur	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	% Recovery
1	75071	1,165	1,140	114,000
	74327	1,114		
	74208	1,140		
4	169308	3,878	3,903	97,575
	168551	3,856		
	172701	3,975		
7	306447	7,825	7,875	112,500
	309699	7,910		
	308766	7,892		

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

a. Perhitungan konsentrasi terukur :

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

- $75071 = 34582,27 + 34740,43x$
 $x = \frac{75071 - 34582,27}{34740,43} = 1,165 \mu\text{g/mL}$
- $74327 = 34582,27 + 34740,43x$
 $x = \frac{74327 - 34582,27}{34740,43} = 1,114 \mu\text{g/mL}$
- $74208 = 34582,27 + 34740,43x$
 $x = \frac{74208 - 34582,27}{34740,43} = 1,140 \mu\text{g/mL}$

4 $\mu\text{g/mL}$

- $169308 = 34582,27 + 34740,43x$
 $x = \frac{169308 - 34582,27}{34740,43} = 3,878 \mu\text{g/mL}$
- $168551 = 34582,27 + 34740,43x$
 $x = \frac{168551 - 34582,27}{34740,43} = 3,856 \mu\text{g/mL}$
- $172701 = 34582,27 + 34740,43x$
 $x = \frac{172701 - 34582,27}{34740,43} = 3,975 \mu\text{g/mL}$

7 µg/mL

$$\begin{aligned} - \quad 306447 &= 34582,27 + 34740,43x \\ x &= \frac{306447 - 34582,27}{34740,43} = 7,825 \text{ } \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \quad 309699 &= 34582,27 + 34740,43x \\ x &= \frac{309699 - 34582,27}{34740,43} = 7,910 \text{ } \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \quad 308706 &= 34582,27 + 34740,43x \\ x &= \frac{169308 - 34582,27}{34740,43} = 7,892 \text{ } \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

b. Perhitungan %Recovery

- 1 µg/mL

$$\%Recovery = \frac{1,140}{1} \times 100\% == 114\%$$

- 2 µg/mL

$$\%Recovery = \frac{3,903}{4} \times 100\% == 97,575\%$$

- 7 µg/mL

$$\%Recovery = \frac{7,875}{7} \times 100\% = 112,5\%$$

Lampiran 29. Uji presisi

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Area terukur	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	SD	%RSD
1	75071 74327 74208	1,165 1,114 1,140	1,140	0,026	2,281
4	169308 168551 172701	3,878 3,856 3,975	3,903	0,063	1,614
7	306447 309699 308766	7,825 7,910 7,892	7,875	0,045	0,571

a. Rata-rata :

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

b. Simpangan deviasi :

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

c. Koefisien variasi :

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

Lampiran 30. Penetapan kadar secara *in vitro*

Perhitungan konsentrasi isoniazid secara *in vitro*

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 300 \text{ ppm} = 0,5 \text{ mL} \times 300 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 150/300 = 0,5 \text{ mL} = 500 \mu\text{L}$$

- a. Penetapan kadar isoniazid secara *in vitro* dan % *diff*

No.	Kadar Sebenarnya (ppm)	Luas Area	Kadar Terukur X (ppm)
1.	300 ppm	a. 305172	7,789
		b. 330708	8,524
.		c. 356326	9,261
			Rata-rata= 8,525

Kadar terukur:

$$\text{a. } X = \frac{305172 - 34582,27}{34740,43} = 7,789 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{b. } X = \frac{330708 - 34582,27}{34740,43} = 8,524 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{c. } X = \frac{356326 - 34582,27}{34740,43} = 9,261 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 31. Penetapan Kadar secara *in vivo*

Waktu Retensi	Luas Area	Kadar Terukur ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
7,300	271104	6,808
6,833	202412	4,830
7,700	160864	3,635
		Rata-rata= 5,091

a. $X = \frac{271104 - 34582,27}{34740,43} = 6,808 \mu\text{g}/\text{ml}$

b. $X = \frac{202412 - 34582,27}{34740,43} = 4,830 \mu\text{g}/\text{ml}$

c. $X = \frac{160864 - 34582,27}{34740,43} = 3,635 \mu\text{g}/\text{ml}$

Lampiran 32. Data statistik perbandingan kadar isoniazid secara *in vitro* terhadap kadar *in vivo*

T-Test

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
invitro	3	8.52467	.736000	7.789	9.261
invivo	3	5.09100	1.602521	3.635	6.808

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		invitro	invivo
N		3	3
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8.52467	5.09100
	Std. Deviation	.736000	1.602521
	Absolute	.175	.231
Most Extreme Differences	Positive	.175	.231
	Negative	-.175	-.191
Kolmogorov-Smirnov Z		.303	.401
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000	.997

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Perlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.638	1	4	.270

Paired Samples Statistics

	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Invitro	8.52467	.736000
	Invivo	5.09100	1.602521
			.424930
			.925216

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 invitro & invivo	3	-.990	.091

Paired Samples Test

	T	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1 invitro - invivo	2.549	2	.126