

Selektivitas Pemisahan Isoniazid dan Asetilisoniazid dalam Plasma Manusia In-Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

(Separation Selectivity of Isoniazid and Asetilisoniazid in Human Plasma In-Vitro by High Performance Chromatography)

NOVI YANTIH^{1*}, YAHDIANA HARAHAP²,
WAHONO SUMARYONO¹, RIAN TO SETIABUDY³, LESTARI RAHAYU¹

- 1) Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta, Indonesia
 - 2) Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok, Indonesia
 - 3) Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia
- *Penulis korespondensi, Hp : 08129624502
e-mail: novi.yantih@univpancasila.ac.id

Diterima 28 Maret 2019, Disetujui 2 Oktober 2019

Abstrak: Dalam rangka studi farmakokinetik isoniazid (INH) sebagai obat anti tuberkulosis, metode bioanalisis diperlukan. Masalah utama yang timbul dalam bioanalisis INH ini adalah struktur INH mirip dengan asetilisoniazid (AcINH) sebagai metabolitnya. Oleh karena itu, metode pemisahan yang selektif diperlukan untuk memisahkan INH dari metabolit dan matriksnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji selektivitas metode pemisahan INH dan AcINH dalam plasma manusia *in-vitro* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sistem KCKT yang digunakan adalah fase balik dengan detektor UV dan heksan sulfonat sebagai pereaksi pasangan ion. Kondisi optimum yang diperoleh menggunakan fase diam C18, fase gerak heksansulfonat pH 2,47–metanol (65:35) dengan laju alir 1ml/menit, dan deteksi pada 265nm. Selektivitas pemisahan metode ditunjukkan dengan nilai resolusi $\geq 1,5$. Nilai faktor ikutan untuk INH dan asetilisoniazid berturut-turut adalah 1,297, dan 1,912. Nilai k yang kurang dari 10 dan nilai N yang lebih besar dari 5000 menunjukkan efisiensi pemisahan yang baik. Hasil percobaan menunjukkan bahwa presisi dan akurasi metode memenuhi syarat untuk uji selektivitas sesuai FDA pada konsentrasi INH dan AcINH berturut-turut 0.1244 dan 0.1188 $\mu\text{g/mL}$ Metode KCKT yang dikembangkan selektif untuk pemisahan INH dan AcINH dalam plasma manusia *in-vitro*.

Kata Kunci: isoniazid, asetilisoniazid, kromatografi cair kinerja tinggi, plasma manusia

Abstract: Bioanalysis method is needed to pharmacokinetic study of INH as antituberculosis. The main problem is INH structure is similar to that of acetyl isoniazid (AcINH) as its metabolite. Therefore, a selective separation method is needed to separate the INH from its metabolite and matrix. The aim of this study was to test the selectivity of separation method of INH and AcINH in human plasma *in-vitro* by high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC system used a reversed phase with UV detector and hexane sulphonate as an ion counter. The optimum conditions was obtained by using C18 as stationary phase, hexane sulphonate (pH 2.47)-methanol (65:35) as mobile phase, with flow rate of 1mL/min, and UV detector at wavelength of 265nm. The selectivity of method separation was indicated by a resolution value of ≥ 1.5 . The tailing factor for INH and AcINH were 1.297, dan 1.912, respectively. The k values were less than 10 and N values were greater than 5000 indicate good separation efficiency. The developing of HPLC was a selective for separating of INH and AcINH in human plasma *in-vitro*.

PENDAHULUAN

DERIVATIF asam nikotinat, isoniazid (INH), adalah salah satu obat pilihan pertama untuk infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. INH bersifat bakterisid, yaitu dapat membunuh 90% populasi kuman dalam beberapa hari pertama pengobatan dan efektif terhadap kuman dalam keadaan metabolik aktif, yaitu kuman yang sedang berkembang. Mekanisme kerja berdasarkan terganggunya sintesis asam mikolat, yang diperlukan untuk membangun dinding bakteri^(1,2).

Dalam rangka studi farmakokinetik isoniazid (INH) sebagai antituberkulosis, metode bioanalisis INH diperlukan. Masalah utama yang timbul dalam bioanalisis INH ini adalah struktur INH mirip dengan asetilisoniazid (AcINH) sebagai metabolitnya^(2,3). Selain itu, kadar analit yang cukup kecil dalam matriks biologi yang kompleks. Oleh karena itu, metode pemisahan yang selektif diperlukan untuk memisahkan INH dari metabolit dan matriksnya.

Penetapan kadar INH dan metabolitnya telah dilaporkan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)^(4,5,6,7). Metode KCKT adalah metode yang baik untuk memisahkan analit dari campuran dalam matriks yang kompleks seperti plasma disamping penggunaannya untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Metode yang tersedia masih memerlukan peningkatan selektivitas terutama antara analit dengan matriksnya. Peningkatan selektivitas metode bioanalisis selain memperhatikan faktor selektivitas juga harus memperhatikan faktor sensitivitas. Semakin kecil konsentrasi analit yang dapat dibedakan responnya dengan matriks maupun analit lain dalam sampel, maka selektivitas metode semakin meningkat. Oleh karena itu pengujian selektivitas metode bioanalisis dilakukan pada konsentrasi terkecil atau *lower limit of quantification*. Pengujian selektivitas menjadi penting sebelum divalidasi parameter analitik lainnya.

Pada penelitian sebelumnya selektivitas metode dilaporkan untuk konsentrasi INH 4,74⁽⁴⁾, dan 0,023-5,16 µg/mL⁽⁵⁾ dalam matriks plasma manusia, sedangkan dalam plasma tikus pada konsentrasi 0,2⁽⁶⁾ µg/mL dan dalam matriks urin pada konsentrasi 1,25 µg/mL⁽⁷⁾. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini dilakukan uji selektivitas metode pemisahan INH dan AcINH dalam plasma manusia menggunakan KCKT. Pengujian dilakukan pada konsentrasi lebih kecil dari konsentrasi yang telah dilaporkan peneliti sebelumnya dengan metode KCKT yang lebih sederhana menggunakan detektor UV.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Bahan baku isoniazid (Zhejiang Jiangbei Pharmaceutical, Zhejiang, China), bahan baku piridoksin hidroklorida dan baku pembanding nikotinamida sebagai baku internal, baku pembanding sintesis asetilisoniazid, kalium bromida, asam klorida, natrium hidroksida, asam fosfat, dan asam heksansulfonat dari Merck, Darmstadt, Germany dengan mutu *pro analysis*, asam asetat glasial dan metanol *pro HPLC* (Mallinckrodt, Dublin, Irlandia), plasma darah manusia dari PMI (Jakarta Pusat, Indonesia), akuabidestilata steril (Otsuka, Indonesia).

Alat

Alat analisis utama yang digunakan dalam penelitian adalah kromatograf cair kinerja tinggi (Shimadzu LC 20 AD), spektrofotometer UV-VIS (UV-1800), dan Fourier Transform Infrared (Shimadzu FT-IR 8400s).

Metode

Pemilihan Larutan Pengendap Protein

Plasma sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam tabung kemudian ditambahkan larutan stok INH, AcINH, baku internal, dan larutan pengendap protein, kemudian divorteks selama 1 menit dan disentrifugasi dengan 3000rpm selama 30 menit. Larutan pengendap protein yang digunakan adalah asetonitril dan metanol dengan jumlah ½, 1, dan 3 kali dari jumlah plasma. Selanjutnya larutan sampel dicek pH-nya dan diinjeksi ke dalam kromatograf sebanyak 20 µL. Larutan pengendap protein yang dipilih adalah larutan pengendap protein yang dapat menghasilkan larutan yang jernih dengan endapan protein terbanyak yang diamati secara visual.

Pemilihan Panjang Gelombang Optimal

Larutan INH, AcINH, dan baku internal masing-masing dibuat spektrum serapannya pada panjang gelombang 200-400nm dan ditampilkan secara *overlay*, sehingga dapat ditentukan panjang gelombang optimum untuk ke-3 analit.

Pemilihan Komposisi dan Laju Alir Fase Gerak

Pemilihan fase gerak dilakukan untuk mendapatkan komposisi fase gerak yang dapat memberikan hasil yang efektif dan efisien dalam analisis secara KCKT. Plasma sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam tabung kemudian ditambahkan sejumlah larutan stok INH, AcINH, dan baku internal dan larutan pengendap protein kemudian divorteks selama 1 menit dan disentrifugasi dengan 3000rpm selama 30 menit. Kondisi kromatograf yang digunakan adalah sebagai berikut:

- Kolom : Oktadesilsilan (C18) atau Oktilsilan (C8) 250x4,6mm
- Volume injeksi : 20 μ L
- Fase gerak :
 1. Dapar fosfat – metanol atau asetonitril dalam berbagai komposisi
 2. Dapar formiat – metanol
 3. Larutan heksansulfonat 5, 10, dan 20mM–metanol dalam berbagai komposisi
- Laju alir : 0,8, 1, atau 1,2mL/menit

Fase gerak yang dipilih adalah fase gerak yang dapat menghasilkan pemisahan yang baik antara analit dan baku internal serta matriks plasma yang ditandai dengan nilai N (jumlah lempeng) yang tinggi, faktor ikutan $\leq 1,2$ dengan luas puncak yang besar, dan resolusi $>1,5$, serta faktor kapasitas kurang dari 10⁽⁸⁾. Pengujian awal dilakukan optimasi pemisahan analit dan baku internal dalam air sebelum dilakukan di dalam plasma.

Uji Kesesuaian Sistem

Sebanyak 20 μ L satu konsentrasi larutan sampel disuntikkan ke dalam sistem KCKT sebanyak lima kali, kemudian diukur luas puncaknya. Syarat kesesuaian sistem adalah $KV \leq 2\%$, faktor ikutan $\leq 1,2$, faktor kapasitas kurang dari 10, dan selektivitas yang tinggi.

Pembuatan Kurva kalibrasi

Sebanyak 20 μ L larutan blangko plasma, larutan blangko plasma ditambah baku internal, dan 6-8 konsentrasi INH dan AcINH. Plasma selanjutnya ditambah pengendap protein, disentrifuse dan supernatan disuntikkan ke dalam kromatograf pada masing-masing konsentrasi. Data pengukuran dibuat kurva kalibrasi hubungan rasio respon terhadap konsentrasi analit. Linearitas ditunjukkan dari perhitungan nilai koefisien korelasi (r) pada persamaan garis linear. Kurva kalibrasi selalu dibuat pada setiap analisis.

Penentuan Batas Kuantifikasi Terendah

Batas kuantifikasi terendah/*lower limit of quantification* (LLOQ) ditentukan terlebih dahulu sebelum uji selektivitas metode. Sebanyak 200 μ L plasma disiapkan yang mengandung INH dan AcINH dengan konsentrasi yang diturunkan setengah kali dari LOQ yang diperoleh dari perhitungan menggunakan data kurva kalibrasi, serta mengandung baku internal. Selanjutnya, plasma ditambah larutan pengendap protein, kemudian divorteks selama 30 detik dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit lalu diambil supernatannya. Sebanyak 20 μ L larutan supernatan disuntikkan ke dalam kromatograf sebanyak 5 kali. Dari data pengukuran kemudian

baku relatif (SBR). Percobaan diulang kembali hingga diperoleh hasil akurasi (% kesalahan) tidak menyimpang dari -20% dan +20%, serta SBR kurang dari 20%^(9,10).

Uji Selektivitas Metode

Sebanyak 20 μ L larutan yang berasal dari preparasi plasma dari sumber 6 subyek berbeda disuntikkan ke dalam kromatograf sebanyak 5 kali pada konsentrasi LLoQ. Selektivitas ditunjukkan dengan akurasi (% kesalahan) tidak menyimpang dari -20% dan +20%, serta SBR kurang dari 20%, baik untuk INH maupun AcINH^(9,10).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Larutan Pengendap Protein

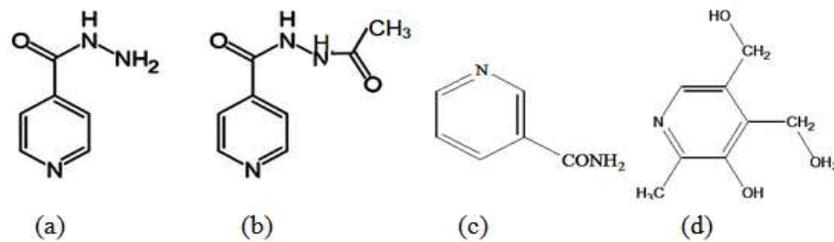
Pemilihan ini dilakukan untuk mengetahui larutan pengendap protein yang cocok yang dapat digunakan dalam mengendapkan protein yang terdapat pada plasma secara efektif. Larutan pengendap protein yang digunakan adalah asetonitril dan metanol. Larutan pengendap protein yang dipilih adalah larutan pengendap protein yang dapat menghasilkan larutan yang jernih dengan jumlah endapan terbanyak.

Hasil menunjukkan pengendapan dengan asetonitril lebih efektif dalam mengendapkan dengan perbandingan 1:1 terhadap jumlah plasma, namun larutan yang dihasilkan tidak jernih karena terbentuk partikel koloid. Partikel koloid dapat dihasilkan karena adanya senyawa dalam plasma berukuran partikel kecil yang tidak terlarut dalam asetonitril. Partikel koloid tersebut tidak mengendap dengan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3000rpm. Hasil pengendapan dari kombinasi asetonitril dengan metanol menunjukkan pengendapan yang paling optimum pada perbandingan asetonitril-metanol (5:1), namun INH kurang stabil dalam sistem pelarut tersebut. Hal ini terlihat dari munculnya beberapa puncak pada kromatogram INH.

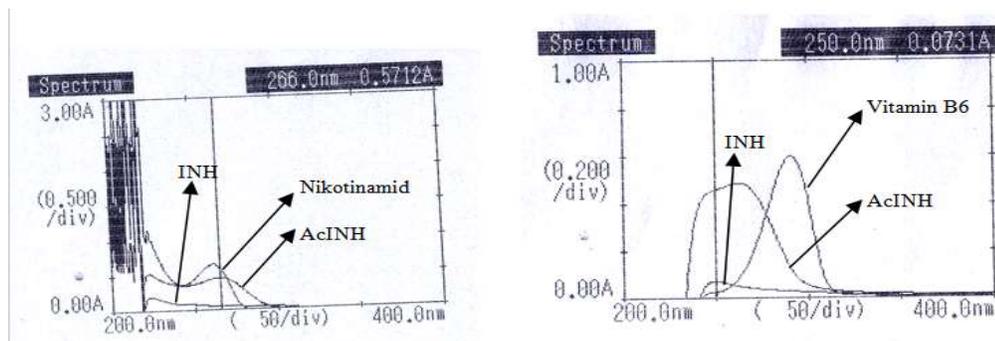
Berdasarkan optimasi pengendap protein, metanol dengan perbandingan 3:1 terhadap plasma digunakan untuk analisis selanjutnya, karena analit lebih stabil dan larutan uji jernih, meskipun hasil pengendapan kurang optimal dibanding dengan asetonitril.

Pemilihan Panjang Gelombang Optimal

Panjang gelombang dioptimasi untuk dijadikan dasar pemilihan panjang gelombang deteksi pada KCKT. Panjang gelombang dipilih berdasarkan panjang gelombang yang memberikan respon optimal untuk ketiga analit. Penentuannya dengan membuat spektrum serapan *overlay* dari ketiga analit (INH, AcINH, dan baku internal) pada panjang gelombang 200-400nm. Struktur kimia ke 4 analit dapat dilihat



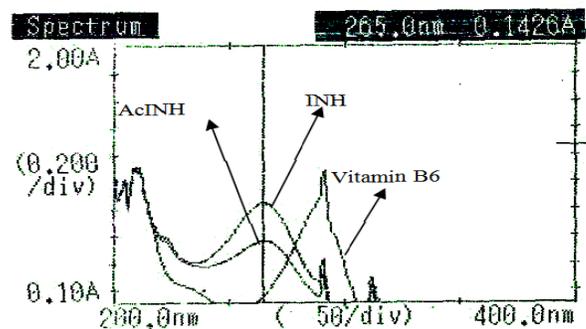
Gambar 1. Struktur kimia INH (a), AcINH (b), nikotinamid (c), dan vitamin B6 (d)



Gambar 2. Spektrum serapan *overlay* INH dan AcINH dengan nikotinamid (a) dan dengan vitamin B6 (b) masing-masing pada konsentrasi 20 bpj pada medium dapar fosfat-metanol pH 3,5

yang sama dari gugus parsial piridin. Adanya gugus aoksokrom yang berbeda dari ke-4 analit menyebabkan panjang gelombang serapan maksimum dan kemampuan menyerap cahaya berbeda-beda, sehingga profil dan respon instrumen (serapan) keempat analit berbeda pula.

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa respon INH paling kecil dibandingkan analit lainnya pada konsentrasi yang sama (20 bpj). Hal ini disebabkan gugus aoksokrom pada AcINH, nikotinamid, dan vitamin B6 lebih potensial dalam menyebabkan adanya pergeseran hiperkromik dibandingkan gugus hidrazin. Gugus hidroksi memberi dampak lebih besar dalam pergeseran batokromik dibandingkan gugus amida. pH fase gerak yang asam menyebabkan elektron sunyi pada gugus hidroksi lebih stabil dibandingkan pada gugus amida, sehingga densitas elektron sunyi terdelokalisasi pada struktur vitamin B6 menjadi lebih tinggi. Peningkatan densitas elektron sunyi yang terdelokalisasi akan menggeser panjang gelombang kearah yang lebih besar (pergeseran merah/batokromik). Hal ini dapat dilihat dari profil spektrum serapan vitamin B6, nikotinamid, dan INH. Panjang gelombang serapan maksimum dari vitamin B6 sekitar 270nm, sedangkan nikotinamid dan INH, berturut-turut pada sekitar 260 dan 250nm. Penambahan gugus asetil pada INH juga menunjukkan pengaruh yang besar terhadap respon dan panjang gelombang serapan maksimum. Gugus asetil menyebabkan terjadinya pergeseran hiperkromik dan batokromik, sama seperti



Gambar 3. Spektrum serapan ultraviolet INH, AcINH, dan Vitamin B6 dengan konsentrasi masing-masing 12 bpj pada tampilan *overlay*

analit baik menggunakan nikotinamid, maupun vitamin B6 sebagai baku internal adalah 250nm, karena pada panjang gelombang tersebut INH paling optimal. Panjang gelombang makin pendek makin tidak spesifik karena pada panjang gelombang tersebut dapat terjadi eksitasi elektron sigma (σ) dari *single bond* maupun elektron phi (π), sehingga pada percobaan selain panjang gelombang 250nm, dicoba juga optimasi sistem KCKT pada panjang gelombang 263, 265, 266, dan 270nm.

Hasil percobaan selanjutnya menunjukkan panjang gelombang deteksi yang digunakan adalah pada 265nm dalam kondisi fase gerak menggunakan pereaksi pasangan ion heksansulfonat 20mM-metanol (65:35). Pada kondisi pelarut yang digunakan ini terlihat bahwa sensitifitas metode meningkat dengan semakin besarnya serapan INH dan AcINH (Gambar

pH 3,5.

Pemilihan Fase Gerak

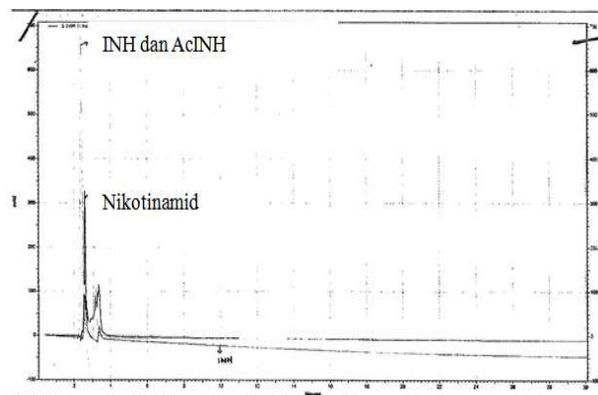
Pemilihan fase gerak dilakukan untuk mendapatkan komposisi fase gerak yang dapat memberikan hasil yang efektif dan efisien dalam analisis secara KCKT. INH memiliki 3 pKa, yaitu 1,8, 3,5, dan 10,8⁽¹¹⁾. Berdasarkan persamaan Handerson-Hasselbalch⁽¹²⁾ dapat dihitung pH optimum agar ketersediaan bentuk tidak terion analit menjadi tinggi. Dari perhitungan diperoleh pH 2,5 sampai dengan pH 3,0 yang dapat menghasilkan bentuk INH tidak terion hingga sekitar 75%. pH yang lebih tinggi dari 3,5 akan menghasilkan bentuk terion INH lebih dari 50%. Dasar perhitungan menggunakan nilai pKa 3,5, karena dengan pKa 1,8 dan 10,8 dihasilkan nilai pH yang lebih kecil dari 2 dan lebih besar dari 9. pH untuk sistem KCKT yang terlalu asam/basa dapat merusak kolom.

Pada awal penelitian, baku internal yang digunakan adalah nikotinamid karena nikotinamid memiliki gugus fungsi dan struktur yang mirip dengan INH sehingga diharapkan factor kapasitas pemisahan kecil. Namun, hasil pemisahan analit dan baku internal belum efektif pada sistem dengan menggunakan dapar fosfat pH 7–asetonitril dengan perbandingan 70:30 dengan kolom C8 panjang 25 cm⁽⁴⁾.

Pada Gambar 4 terlihat jelas bahwa puncak INH, AcINH, dan nikotinamid muncul di waktu retensi yang hampir sama. Kromatogram yang dihasilkan pecah jika digunakan fase gerak dengan komposisi asetonitril. Oleh karena itu pada penelitian ini, beberapa komposisi fase gerak telah dicoba yaitu dapar fosfat 0,1 M pH 2,8; 3; 3,5; 4; 4,5; 4,5; 5 dengan metanol dalam beberapa perbandingan, heksasulfonat dengan metanol, dan dapar formiat dengan metanol dan digunakan 2 jenis kolom yaitu C8 (panjang 250mm) dan C18 (panjang 150 mm dan panjang 250

mm) serta baku internal vitamin B6. Hasil waktu retensi INH, AcINH, dan vitamin B6 sebagai baku internal dalam air dengan laju alir 1ml/menit dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa pada penggunaan dapar fosfat 0,1M pH 2,8 dan pH 3,5 waktu retensi yang dihasilkan INH, AcINH, dan vitamin B6 berdekatan. Namun, pada perbandingan 50:50 baik pada pH 2,8 maupun 3,5 memberikan waktu retensi INH, AcINH, dan vitamin B6 yang mulai memisah.

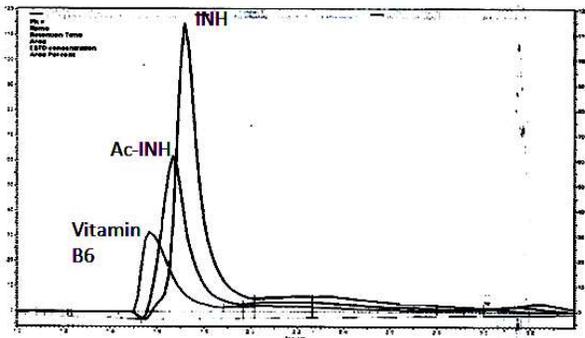
Berdasarkan Gambar 5 dan 6 terlihat bahwa ketiga analit menghasilkan retensi yang mulai berjauhan, namun belum memenuhi kriteria pemisahan yang baik. Dengan demikian, kondisi KCKT dengan fase gerak dapar fosfat pH 2,8 dan 3,5-metanol dengan berbagai perbandingan, kolom C18 panjang 150mm dan 250mm tidak dapat digunakan karena belum menghasilkan pemisahan antara ketiga analit. Selain dengan menggunakan dapar fosfat, pada penelitian ini dilakukan juga optimasi dengan menggunakan dapar formiat pH 2,8-metanol dengan perbandingan



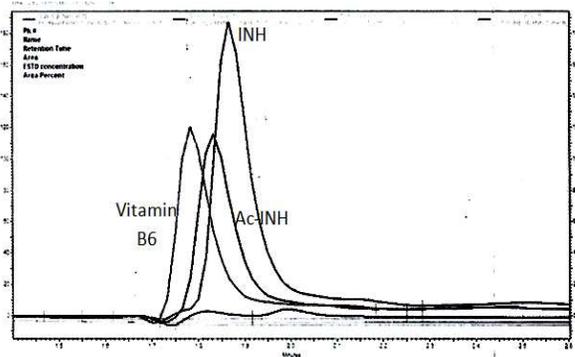
Gambar 4. Kromatogram INH, AcINH, dan nikotinamid tampilan overlay

Tabel 1. Waktu retensi analit dan baku internal dalam fase gerak dapar fosfat-metanol

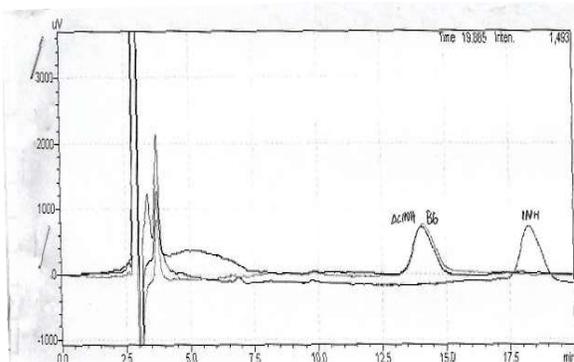
pH	Perbandingan dapar fosfat 0,1 M-Metanol	Waktu retensi (menit)		
		INH	AcINH	Vitamin B6
2,8	85:15	1,866	1,867	1,707
	80:20	1,717	1,667	1,700
	60:40	1,732	1,716	1,600
	50:50	1,717	1,667	1,566
	40:60	1,701	1,649	1,583
3,5	70:30	1,950	1,900	1,717
	60:40	1,767	1,733	1,600
	50:50	1,867	1,833	1,783
	40:60	1,700	1,667	1,667
	30:70	1,750	1,717	1,667



Gambar 5. Kromatogram INH, AcINH, dan vitamin B6 tampilan overlay dengan fase gerak dapar fosfat 0,1 M pH 2,80-metanol (50:50)



Gambar 6. Kromatogram INH, AcINH, dan vitamin B6 tampilan overlay dengan fase gerak dapar fosfat 0,1 M pH 3,5-metanol (50:50)



Gambar 7. Kromatogram INH, AcINH, dan vitamin B6 tampilan overlay fase gerak dapar formiat-metanol (60:40)

30:70; 40:60; 50:50; 60:40 menggunakan kolom C8 panjang 250mm pada panjang gelombang 266nm dan laju alir 1ml/menit. Berdasarkan hasil percobaan, kromatogram menunjukkan pemisahan yang belum efektif untuk INH, AcINH, dan vitamin B6. Pada penggunaan 60:40 diperoleh waktu retensi pada menit ke-18, sehingga kondisi tersebut tidak efektif dan efisien (Gambar 7).

Penelitian dilanjutkan dengan menggunakan fase gerak pasangan ion heksasulfonat 20mM dengan metanol perbandingan 65:35 menggunakan kolom C18 panjang 25cm dengan suhu 25°C, 30°C, dan 40°C serta laju alir yang disesuaikan yaitu 0,5 ml/menit; 0,8 ml/menit; dan 1ml/menit. Preparasi sampel yang digunakan berupa campuran ketiga analit dalam air. Berdasarkan hasil yang didapatkan, resolusi terbaik (> 1,5) diperoleh pada kondisi kolom C18 250mm dengan suhu 30°C, fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2,47-metanol (65:35) dengan 1 ml/menit, dan panjang gelombang deteksi 265nm.

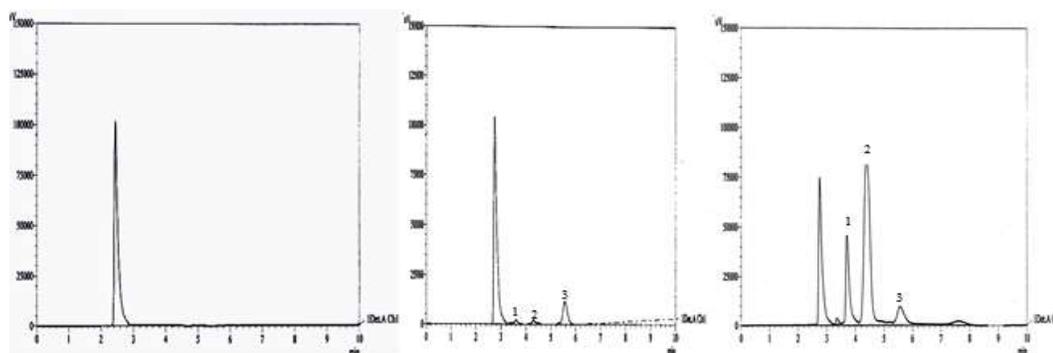
Berdasarkan Tabel 2 dan 3 dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum untuk memisahkan INH, AcINH, dan vitamin B6 dengan fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2.47-metanol (65:35) menggunakan baik kolom C8 maupun C18 dengan panjang kolom 25 cm memenuhi persyaratan karena nilai resolusi ketiga analit diantara >1,5 dan nilai faktor ikutan ketiga analit di bawah 1,2⁽⁸⁾. Penggunaan kolom C8 menghasilkan waktu pemisahan yang lebih cepat dari kolom C18. Hal ini karena kolom C18 lebih nonpolar dari C8, sehingga pasangan ion yang bersifat nonpolar tertahan lebih lama pada kolom C18 dibandingkan C8. Mekanisme pemisahan dengan kromatografi fase balik pasangan ion ini adalah meningkatkan afinitas analit polar terhadap fase diam yang nonpolar dengan terbentuknya pasangan ion antara analit yang terion dengan pereaksi pasangan ionnya. Peningkatan afinitas terjadi karena analit akan menjadi lebih nonpolar setelah membentuk pasangan ion, karena pereaksi pasangan ion memiliki gugus nonpolar. Pada penelitian ini gugus heksan adalah

Tabel 2. Waktu retensi dengan fase gerak heksasulfonat 20mM-metanol (65:35) dalam berbagai suhu dan laju alir pada kolom C18

Suhu (°C)	Laju alir (ml/menit)	Waktu retensi (menit)			Resolusi
		INH	AcINH	Vitamin B6	
25	0,5	5,651	5,217	7,605	<1,5
	0,8	3,957	3,595	5,476	<1,5
	1	3,656	3,288	5,111	<1,5
30	0,5	6,308	5,751	8,805	<1,5
	0,8	4,021	3,670	5,643	<1,5
	1	3,952	3,479	5,587	>1,5
40	0,5	5,962	5,568	8,184	<1,5
	0,8	3,693	3,475	5,102	<1,5

Tabel 3. Waktu retensi, luas area, faktor ikutan, dan resolusi analit dengan fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2,47-metanol (65:35) pada kolom C18 dan C8

Analit	Konsentrasi (µg/mL)	Luas Puncak	Waktu retensi (menit)	Faktor ikutan	Resolusi
Kolom C18					
AcINH	12	468510	3,479	1,260	2,020
INH	12	693558	3,952	1,263	1,885
Vitamin B6	12	255548	5,587	1,261	3,535
Kolom C8					
AcINH	12	102446	3,779	1,160	3,183
INH	12	95023	4,069	1,101	1,508
Vitamin B6	12	302145	5,011	0,911	1,923

**Gambar 8. Kromatogram blangko plasma (a), sampel plasma mengandung AcINH (1) dan INH (2) pada konsentrasi LLoQ (b), dan sampel plasma konsentrasi AcINH (1) dan INH (2) masing-masing 17,5µg/mL menggunakan sistem fase diam C18 suhu 30°C, fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2,47-metanol (65:35) dengan laju alir 1mL/men, detektor UV-265nm dan Vitamin B6 (3) sebagai baku internal**

gugus nonpolar dari pereaksi pasangan ion. Kolom yang digunakan selanjutnya adalah kolom C18 (Gambar 8) karena area puncak yang dihasilkan untuk ke-3 analit lebih besar dari area pada penggunaan kolom C8. Hal ini akan meningkatkan sensitivitas metode.

Uji Kesesuaian Sistem

Kesesuaian sistem diuji untuk memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung. Hasil dari penyuntikan sebanyak 6 kali memberikan simpangan baku rata-rata (SBR) ketiga analit yang kurang dari 2,0%. Resolusi ke-2 analit >1,5. Nilai faktor ikutan untuk INH dan AcINH berturut-turut adalah 1,297, dan 1,912. Nilai k yang kurang dari 10 dan nilai N yang lebih besar dari 5000 menunjukkan efisiensi pemisahan yang baik. Hasil menunjukkan metode memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia Edisi V⁽⁸⁾.

Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat untuk digunakan sebagai dasar perhitungan konsentrasi analit dalam sampel. Kurva juga sekaligus dapat menggambarkan linearitas metode. Persamaan kurva yang dihasilkan adalah $Y=0,6219X-0,0388$ dengan $r=0,9992$ untuk INH dan $Y=0,4908X-0,0254$ dengan $r=0,9998$ untuk AcINH

titik konsentrasi yang diuji memenuhi syarat akurasi dan presisi metode^(9,10).

Batas Kuantifikasi Terendah

Batas kuantifikasi terendah atau *lower limit of quantification* (LLOQ) merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan dengan tetap memenuhi syarat akurasi dan presisi^(9,10). Semakin kecil nilai LLOQ menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Dalam analisis kadar obat dalam plasma, diperlukan suatu metode yang cukup sensitif yang dapat mengukur hingga konsentrasi terkecil obat dalam plasma. Menurut EMEA (2012), metode dapat digunakan untuk studi farmakokinetik bila nilai LLOQ yang dapat lebih kecil sama dengan 5% C_{maks} ⁽⁹⁾. LLOQ untuk INH dan AcINH berturut-turut adalah 0.1258 dan 0.1188µg/mL. Hasil menunjukkan bahwa metode cukup sensitif dalam mengkuantifikasi INH dan AcINH dalam plasma manusia. LLOQ ini memberi hasil yang lebih baik dari analisis INH dalam urin dengan spektrofotometri cahaya tampak pada studi farmakokinetik INH⁽¹³⁾. Hal ini memperkuat bukti bahwa metode KCKT lebih sensitif dari metode spektrofotometri^(14,15). Bila dibandingkan LLOQ dari penelitian sebelumnya dengan metode KCKT, hasil penelitian juga lebih sensitif. Hasil penelitian dengan

asetonitril-heptansulfonat 20mM pH 2,5 pada laju alir 2mL/menit menunjukkan nilai LLoQ lebih kecil yaitu 0,023 µg/mL⁽⁵⁾. Namun, dari sisi efisiensi metode ini lebih baik karena penggunaan fase gerak yang lebih sedikit. Nilai LLoQ hasil penelitian ini cukup memadai untuk studi farmakokinetik INH karena lebih kecil dari 1/20 (seperduapuluh) Cmaks INH dalam plasma, yaitu sebesar 0,2 µg/mL⁽²⁾. Sesuai dengan EMEA, LLoQ untuk studi farmakokinetik harus lebih kecil dari 5% Cmaks analit⁽⁹⁾.

Uji Selektivitas Metode

Uji selektivitas metode untuk melihat kemampuan metode menghasilkan respon yang berbeda antara analit dengan analit lainnya maupun antara analit dengan matriks. Analisis dalam plasma manusia perlu diuji selektivitasnya pada simulasi analit dalam matriks yang berasal dari 6 plasma manusia yang berbeda^(9,10). Konsentrasi analit dalam matriks plasma adalah pada konsentrasi LLoQ. Hasil menunjukkan bahwa metode selektif dengan nilai SBR dan % kesalahan yang memenuhi syarat^(9,10).

SIMPULAN

Sistem kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom fase balik C18, fase gerak heksansulfonat 20mM pH 2,47 dengan laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 20µL, detektor pada 265nm, dan baku internal vitamin B6 menghasilkan pemisahan yang selektif untuk analisis INH, AcINH dalam plasma.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Kemenristekdikti yang telah mendanai penelitian ini melalui program hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO (World Health Organization). 2010. Treatment of Tuberculosis: Guidelines. 4th. Geneva: World Health Organization; Stop TB Initiative (World Health Organization).
2. Klein DJ, S Boukouvala, EM McDonagh, SR Shuldiner, N Laurieri, CF Thorn, RB Altman, TE Klein. *PharmGKB summary: isoniazid pathway, pharmacokinetics*. Pharmacogenet Genomics; 2016. 26(9): 436–444.
3. Teixeira RLF, RG Morato, PH Cabello, LMK Muniz, ASR Moreira, AL Kritski, FCQ Mello, PN Suffys, AB Miranda, dan AR Santos. *Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in brazilian TB patients*, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011. 106 (6). Rio de Janeiro. Sept. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000600011>.
4. Stella. Optimasi dan validasi metode analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet 4 fixed dosecombination(4FDC) dan plasma in vitro secara kromatografi cair kinerja tinggi [Skripsi] FMIPA UI. 2011.
5. Madhavi R, Mohana KA, Shobha RG, Mounika D. Isoniazid: *A Review of Analytical Methods*. Asian J. Pharm. Ana. 2015. 5(1):41-5.
6. Bhandari R, IP Kaur. *A sensitive HPLC method for determination of isoniazid in rat plasma, brain, liver, and kidney*, J Chromat Separation Techniq, 2012. 3(3):1-5. ISSN2157-7064 JCGST.
7. Kumar AKH, V Sudha, G Ramachandran. *Simple and rapid method for simultaneous determination of isoniazid and acetylisoniazid in urine by HPLC*. Asian J Biomed and Pharm Sci. 2014. 4(34):46-50.
8. Kemenkes. Farmakope Indonesia V. Direktorat Jendral Bina Farmasi dan Alat Kesehatan. Kementerian Kesehatan RI. 2014. ISBN 987-602-235-463-5:567-9.
9. EMEA (European Medicines Agency). 2012. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009.
10. FDA (Food Drug Administration). Guidance for industry bioanalytical method of validation; available from: www.fda.gov/cder/guidance/index.htm. 2018.
11. Atta NF, A Galal, RA Ahmed. *Voltammetric behavior and determination of isoniazid using PEDOT electrode in presence of surface active agents*. Int J Electrochem Sci. 2011. 6(10):5097-113.
12. Oommen V, Ganesh G, Vadivel K, Kanthakumar P. The Henderson-Hasselbalch equation : a three dimensional teaching model. Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 2016. 60(1):70-75.
13. Brown SA, NA Ezejiolor, OE Orisakwe. *Pharmacokinetics of isoniazid with or without ofloxacin*. International Current Pharmaceutical Journal. 2012.1(12):403-9.
14. Skoog DA, DM West, FJ Holler. SR Crouch. *Fundamental of analytical chemistry*. Ninth Edition. Mary Finch Publisher. 2014. ISBN-13: 978-0-495-55828-6. ISBN-10: 0-495-55828-1
15. Snyder LR, JJ Kirkland, JW Dolan. *Introduction to modern Liquid Chromatography*. Third Edit. United States of America: Wiley Publication. 2010.