

PEMISAHAN RIFAMPISIN, ISONIAZID, DAN PIRAZINAMIDA DENGAN KLT TERIMPREGNASI PARAFIN

Prawiranata, I.P.H.¹, Widhiartini, I.A.A.², Cahyadi, K.D.¹, Wirasuta, I.M.A.G.¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

²Bagian Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Korespondensi: I Putu Hengky Prawiranata

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837

Email : hengky_prawiranata@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan pengembangan metode kromatografi untuk pemisahan rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida menggunakan pelat KLT terimpregnasi parafin. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode pemisahan rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida secara simultan.

KLT silika gel 60 GF₂₅₄ diimpregnasi menggunakan parafin 10% (v/v) dalam dietil eter. Beberapa variasi fase gerak yang dioptimasi mengacu pada campuran etanol : air (70:30 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 37%. Parameter kromatografi terbaik diperoleh dari pemisahan menggunakan fase gerak campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin. Fase gerak ini juga memberikan pemisahan terbaik untuk ketiga senyawa dengan $R_s > 1$ dan $\alpha > 1$. Pelat dipindai pada panjang gelombang 335 nm untuk analisis rifampisin dan 275 nm untuk analisis isoniazid dan pirazinamida menggunakan KLT-spektrofotodensitometer. Metode yang dikembangkan dapat digunakan sebagai acuan untuk pemisahan rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida pada sampel obat ataupun sampel biologis.

Kata Kunci: Rifampisin, isoniazid, pirazinamida, KLT-Spektrofotodensitometri, impregnasi

1. PENDAHULUAN

Standar terapi tuberkulosis secara umum menggunakan obat anti tuberkulosis (OAT) seperti isoniazid, rifampisin, etambutol, pirazinamida, dan streptomisin yang merupakan kelompok obat primer (Dirjen Binfar dan Alkes, 2005). Salah satu kombinasi OAT yang efektif dan sering digunakan dalam terapi tuberkulosis adalah kombinasi tiga obat yaitu isoniazid, rifampisin, dan pirazinamida (Smith, 1999). Dalam upaya memantau efektifitas kombinasi ketiga obat tersebut, perlu dilakukan kegiatan Therapeutic Drug Monitoring (TDM) yaitu dengan menetapkan kadar ketiga OAT tersebut di darah setelah obat tersebut dikonsumsi. Dalam melakukan kegiatan TDM tentunya diperlukan suatu metode awal yang baik untuk memisahkan kombinasi ketiga obat tersebut secara simultan sebelum dilakukan penetapan kadar terhadap ketiga obat tuberkulosis tersebut (Dirjen Binfar dan Alkes, 2005).

Salah satu metode pemisahan ketiga OAT tersebut menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor UV-Visibel. Metode KCKT ini menggunakan fase

gerak yang mengandung tetrabutylammonium hidroksida yang dapat memperpendek usia kolom (Glass et al., 2007).

Metode lain yang juga telah dilaporkan untuk memisahkan ketiga kombinasi OAT tersebut bersama etambutol adalah Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT) densitometri fase balik. Pada metode ini digunakan fase diam berupa silika gel 60 RP-18 WF₂₅₄ dan fase gerak campuran pelarut etanol dan air dengan perbandingan (70:30 v/v) yang ditambahkan 5% asam asetat glasial dan 1% amonia 37%. Metode ini telah mampu memisahkan ketiga kombinasi OAT tersebut secara simultan dengan baik (Shewiyoa et al., 2012). Pelat KLTKT C₁₈ memiliki harga yang relatif mahal dan susah diperoleh di Indonesia. Sanjaya dkk (2012) melaporkan penggunaan pelat KLTKT fase normal yang diimpregnasi dengan parafin 10% memiliki kinerja yang hampir mirip dengan pelat KLTKT C₁₈.

Berdasarkan penelitian tersebut, maka pada penelitian ini dikembangkan metode pemisahan tiga OAT primer menggunakan pelat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) fase normal yang

impregnasi dengan parafin 10%. Pengembangan metode ini bertujuan untuk mendapatkan metode yang relatif murah dengan validitas yang tinggi.

2. BAHAN dan METODE

2.1 Bahan Penelitian

Bahan kimia dan pelarut yang digunakan pada penelitian ini dari Merck Germany antara lain: metanol pro analisis (p.a), etanol p.a, propanol p.a, asam asetat glasial p.a, larutan amonia 25% p.a, etil asetat p.a, aseton p.a, kristal iodin p.a, ninhidrin p.a, dietil eter p.a, asetonitril p.a, dan dietilamin p.a serta bahan-bahan lain seperti natrium hidroksida (NaOH), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), minyak parafin teknis (PT Brataco), dan Water for Irrigation (WFI). Bahan yang diteliti yaitu senyawa standar rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida yang diperoleh dari BPOM RI. Fase diam yang digunakan adalah pelat KLT dan KLTKT Silika Gel 60 GF₂₅₄ (Merck-Germany).

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang umum dipakai dalam laboratorium analitik, seperti pipet ukur (IWAKI Pyrex), labu ukur (IWAKI Pyrex), gelas beaker (IWAKI Pyrex), erlenmeyer (IWAKI Pyrex), tabung reaksi, dan vial. Selain itu, juga digunakan tabung mikro (effendorf), pipet mikro, timbangan analitik (AND), ballfiller, oven (Mettler), alat pengaduk mekanik (Ika vibrax VXR basic), alat sentrifugasi dan tabungnya (PLC series), pompa vakum (Gast), pH-meter (Oakton), manifold (Phenomenex), penotol nanomat dan Linomat V, serta KLT-Spektrofotodensitometer (CAMAG-Scanner 3).

2.3 Prosedur Penelitian

Penyiapan larutan baku kerja, masing-masing senyawa dibuat larutan baku induk dengan konsentrasi 1 mg/mL dalam metanol. Larutan baku kerja dibuat dengan mengencerkan larutan baku induk hingga diperoleh konsentrasi masing-masing senyawa 50 µg/mL.

Impregnasi pelat, pelat KLT silika gel GF₂₅₄ berukuran 5x10 cm sebanyak 4 lembar dicuci dengan metanol dan diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit. Pelat diimpregnasi dengan parafin 10% (v/v) dalam dietil eter, dan dikeringkan selama 1 jam pada suhu ruangan.

Kromatografi, larutan baku kerja masing-masing senyawa ditotolkan secara tunggal dan campuran sebanyak 10 µL (500 ng) pada keempat pelat dengan jarak antar totolan 1 cm dan lebar totolan 3,5 mm menggunakan linomat V. Masing-masing

pelat dielus dengan empat fase gerak yang berbeda yaitu :

- Etanol : air (70:30 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%
- Etanol : air (80:20 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%
- Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%
- Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin

Pelat dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sebelumnya sudah dijenuhkan dengan fase gerak selama 30 menit, pelat dielus dengan arah vertikal menggunakan berbagai komposisi fase gerak hingga 9 cm dari tepi bawah pelat. Masing-masing noda pada pelat dipindai dengan spektrofotodensitometer-KLT Scanner 3 pada panjang gelombang 335 nm untuk rifampisin serta 275 nm untuk isoniazid dan pirazinamida, karena kedua senyawa ini memiliki panjang gelombang maksimum yang berdekatan.

Analisis pemisahan, fase gerak terbaik dipilih dengan cara membandingkan parameter kromatografi (selektivitas (α) > 1, resolusi (R_s) > 1, dan tailing factor (Tf) = 1) (Sherma and Fried, 1994).

3. HASIL

Pemisahan senyawa uji pada 4 fase gerak ditampilkan pada gambar A.1. Nilai R_f senyawa uji pada 4 fase gerak ditampilkan pada tabel B.1, sementara nilai R_s dan α ditampilkan pada tabel B.2, B.3, B.4, dan B.5. Fase gerak (d) memberikan nilai R_f yang baik (Tabel B.1), serta nilai R_s dan α yang memenuhi persyaratan untuk pemisahan ketiga senyawa secara simultan (Tabel B.5). Fase gerak (a) dan (b) tidak memberikan hasil pemisahan yang baik. Fase gerak (c) memberikan kromatogram rifampisin yang tidak simetris (fronting), sementara fase gerak (d) memberikan kromatogram rifampisin yang lebih simetris.

4. PEMBAHASAN

Pemisahan suatu senyawa secara simultan dikatakan baik apabila memenuhi persyaratan nilai R_s > 1 dan α > 1 (Sherma and Fried, 1994), dimana dalam penelitian ini nilai tersebut diberikan oleh fase gerak (d). Fase gerak ini juga memberikan nilai R_f yang baik, dimana syarat untuk memperoleh pemisahan senyawa yang baik secara simultan harus menghasilkan nilai R_f yang berada pada rentang 0,20 hingga 0,80 (Shewiyoa et al., 2012).

Fase gerak (c) memberikan kromatogram rifampisin yang tidak simetris (fronting), dengan nilai Tf = 0,65. Tf akan bernilai lebih kecil dari 1 jika kromatogram berbentuk fronting, dan sebaliknya Tf akan bernilai lebih besar dari 1 jika kromatogram berbentuk tailing (Sherma and Fried, 1994). Pada fase gerak (d) kromatogram rifampisin yang dihasilkan lebih simetris dibandingkan pada fase gerak (c), dengan nilai Tf = 1,062, begitu juga dengan kromatogram isoniazid dan pirazinamida yang memberikan nilai Tf mendekati 1.

Fase gerak (c) mengandung agen pembasa amonia 25%, yang selama proses elusi sangat mudah menguap. Penggunaan amonia 25% yang mudah menguap ini telah dilaporkan sangat berpengaruh pada analisis opiat dan asam barbiturat (Dewi dkk., 2009). Rifampisin pada fase gerak (c) mengalami autohidrolisis, hal ini disebabkan karena penggunaan amonia 25% pada campuran fase gerak (c) yang sangat mudah menguap sehingga terjadi penurunan pH fase gerak menjadi lebih asam. Rifampisin akan mengalami hidrolisis menjadi senyawa 3-formil rifampisin dan 1-amino-4-metil piperazine pada suasana asam (pH \leq 4,5) dan akan mengalami oksidasi menjadi rifampisin kuinon pada suasana basa (pH \geq 7,5) (Melo et al., 2011).

Rifampisin pada fase gerak (d) yang memiliki pH 6,85 selama proses elusi berlangsung tidak mengalami autohidrolisis sehingga memberikan bentuk kromatogram yang lebih simetris, hal ini dikarenakan fase gerak (d) mengandung dietilamin sebagai agen pembasa yang cenderung bersifat lebih stabil daripada amonia 25%. Penggunaan dietilamin yang lebih stabil sebagai agen pembasa juga telah dilaporkan pada analisis opiat dan asam barbiturat (Dewi dkk., 2009). Ditinjau dari parameter Rs, α , dan Tf, maka fase gerak terpilih untuk pemisahan senyawa rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida adalah fase gerak (d) dengan campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin.

5. KESIMPULAN

Metode KLT-Spektrofotodensitometri yang dapat digunakan untuk memisahkan rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida secara simultan menggunakan fase diam pelat KLT fase normal yang diimpregnasi dengan parafin 10% dalam dietil eter dan fase gerak campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin (pH 6,85) yang menghasilkan pemisahan dengan nilai resolusi (Rs) > 1,

selektivitas (α) > 1, dan tailing factor (Tf) mendekati 1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Drs. I Nyoman Kadjeng Widjaja, Apt., M.Si., selaku dosen dan ketua kelompok keahlian analisis farmasi di Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Udayana atas bantuan bimbingan, masukan, saran, dan dukungannya.

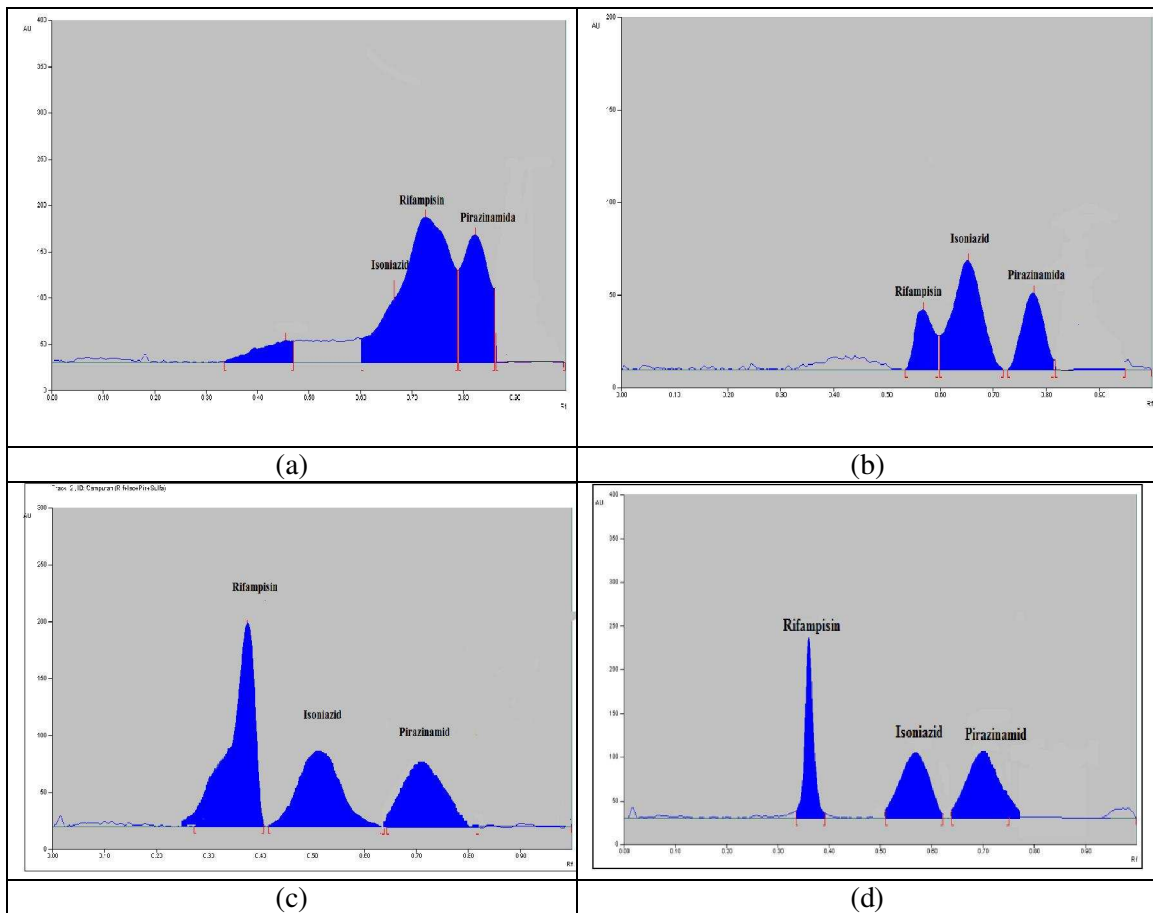
DAFTAR PUSTAKA

- Dewi, N.L.K.A.A., L.P. Mirah., dan I.N.K. Widjaja. (2009). Studi Bentuk Spektrum Senyawa Opiat dan Asam Barbiturat Pada Pelat KLT Akibat Perbedaan pH Pelarut, Suhu dan Lama Penguapan Pelarut Serta Lama Penyimpanan Pelat Setelah Diuapkan (Skripsi). Denpasar: Universitas Udayana. hal. 46-47.
- Dirjen Binfar dan Alkes. (2005). *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Tuberkulosis*. Jakarta: Depkes RI. hal. 9-10, 24-25.
- Glass, B.D., S. Agatonovic-Kustrin., Y.J. Chen., and M.H. Wisch. (2007). Optimization of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Rifampicin, Isoniazid, and Pyrazinamide in a Fixed-Dose Combination using Artificial Neural Networks. *J. Chromatogr*, 45: 38-44.
- Melo, L.P., R.H.C. Queiroz., and M.E.C. Queiroz. (2011). Automated Determination of Rifampicin in Plasma Samples by in-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled With Liquid Chromatography. *J. Chromatogr*, 879: 2454-2458.
- Sanjaya, S.M.T., N.M.P. Susanti., dan I.N.K. Widjaja. (2012). Pengembangan Metode Kromatografi Lapis Tipis-Spektrofotodensitometri Untuk Analisis Metil-, Etil-, Propil-, dan Butil 4-Hidroksibenzoat Pada Kosmetik (Skripsi). Denpasar: Universitas Udayana. hal. 2-3.
- Sherma, J., and B. Fried. (1994). *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Third Edition. New York: Marcel Dekker Inc. (Electronic Version). p. 5-6, 39, 60, 139, 143-145.
- Shewiyoa, D.H., E. Kaale., P.G. Risha., B. Dejaegher., J.S. Verbeke., and Y.V. Heyden. (2012). Optimization of a Reversed-Phase High Performance Thin Layer Chromatography Method for the Separation of Isoniazid, Ethambutol, Rifampicin and Pyrazinamide in Fixed-Dose Combination Antituberculosis Tablets. *J. Chromatogr A*: 1-7.

Smith, P.J. (1999). Determination of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide by High Performance Liquid Chromatography After Their Simultaneous Extraction From Plasma. *Int J Tuberc Lung Dis*, 3: 325-328.

Srivastava, ManMohan. (2011). High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). Heidelberg Springer. p. 213-217.

APENDIK A.



Gambar A.1. Profil Kromatogram Campuran Senyawa Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida

Keterangan:

Fase diam : TLC Silika gel 60 GF₂₅₄ terimpregnasi parafin

Fase gerak :

- (a) = etanol : air (70:30 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%;
- (b) = etanol : air (80:20 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%;
- (c) = etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%;
- (d) = etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin

APENDIK B.

Tabel B.1 Nilai Rf Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida Pada Berbagai Komposisi Fase Gerak

Fase gerak	Rf Senyawa		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
(a)	0,77	0,73	0,83
(b)	0,57	0,66	0,78
(c)	0,40	0,53	0,70
(d)	0,35	0,54	0,69

Tabel B.2 Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (70:30 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(0,22 ; 1,24)	(0,44 ; 1,46)
Isoniazid	(0,22 ; 1,24)	(0 ; 1)	(0,65 ; 1,80)
Pirazinamida	(0,44 ; 1,46)	(0,65 ; 1,80)	(0 ; 1)

Tabel B.3 Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (80:20 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(0,86 ; 1,47)	(2,10 ; 2,68)
Isoniazid	(0,86 ; 1,47)	(0 ; 1)	(0,96 ; 1,83)
Pirazinamida	(2,10 ; 2,68)	(0,96 ; 1,83)	(0 ; 1)

Tabel B.4 Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(0,76 ; 1,70)	(2,52 ; 4,27)
Isoniazid	(0,76 ; 1,70)	(0 ; 1)	(1,27 ; 2,52)
Pirazinamida	(2,52 ; 4,27)	(1,27 ; 2,52)	(0 ; 1)

Tabel B.5 Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(1,52 ; 2,18)	(2,96 ; 4,13)
Isoniazid	(1,52 ; 2,18)	(0 ; 1)	(1,15 ; 1,90)
Pirazinamida	(2,96 ; 4,13)	(1,15 ; 1,90)	(0 ; 1)

Keterangan: Fase diam menggunakan KLT Silika gel 60 GF₂₅₄; Rs= resolusi; α = selektivitas

APENDIK C

- Persamaan C.1 :

$$k = \frac{(1-Rf)}{Rf} \quad (\text{Sherma and Fried, 1994}).$$

- Persamaan C.2 :

$$R_s = 2 \times \frac{Rf_2 - Rf_1}{W_s2 + W_s1} \quad (\text{Sherma and Fried, 1994}).$$

- Persamaan C.3 :

$$\alpha = \frac{k \text{ rifampisin}}{k \text{ isoniazid}} \quad (\text{Sherma and Fried, 1994}).$$

- Persamaan C.4 :

$$Tf = \frac{a+b}{2 \times a} \quad (\text{Sherma and Fried, 1994}).$$



JURNAL FARMASI UDAYANA

JURUSAN FARMASI-FAKULTAS MIPA-UNIVERSITAS UDAYANA

BUKIT JIMBARAN - BALI
• (0361) 703837

• Email: jurnalfarmasiudayana@gmail.com

SURAT PERNYATAAN PERSETUJUAN PEMBIMBING

Yang bertandatangan di bawah ini, menyatakan bahwa :

Artikel dengan judul : Pemisahan Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida dengan KLT Terimpregnasi Parafin

Disusun oleh : I Putu Hengky Prawiranata

NIM : 0908505007

Email mahasiswa : hengky.prawiranata@yahoo.com

Telah kami setuju untuk dipublikasi pada "Jurnal Farmasi Udayana".

Demikian surat pernyataan ini kami buat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bukit Jimbaran, 8 Juli 2013
Pembimbing Tugas Akhir

Kadec Duwi Cahyadi, s.Farm., M.Si., Apt
NIDN. 0203088701