

Kromatografi Lapis Tipis Video Densitometri sebagai Alternatif Analisis Simultan Rifampisin dan Isoniazid dalam Sediaan Kombinasi

Fauzan Zein Muttaqin^{*}, Yusril Panji, Deden Indra Dinata

Artikel Penelitian

Abstract: Rifampicin and isoniazid are first-line antituberculosis drugs widely used in tuberculosis therapy. Simultaneous determination of both compounds is required to ensure the quality and safety of pharmaceutical preparations. This study aimed to develop a Thin-Layer Chromatography (TLC) Video Densitometry method as an alternative approach for the simultaneous analysis of rifampicin and isoniazid in combination tablets. Separation was performed using silica gel GF254 as the stationary phase and methanol:ammonia (10:1) as the mobile phase. Spot visualization was carried out under UV light at 254 nm and analyzed using ImageJ software to obtain the area under curve (AUC) values. Method validation included selectivity, linearity, sensitivity, accuracy, and precision tests. The results showed that the R_f values of rifampicin and isoniazid were 0.78 and 0.66, respectively, with a selectivity factor of 1.18. The calibration curves demonstrated good linearity with determination coefficients of 0.9987 for rifampicin and 0.9992 for isoniazid. The recovery values ranged from 99.20–99.70% for rifampicin and 99.56–99.80% for isoniazid, while the %RSD values were less than 2% for both compounds. The assay results of combination tablets showed rifampicin levels of 82.42–82.46% and isoniazid levels of 78.46–78.48%. Based on the validation results, the TLC video densitometry method fulfilled the validation parameters and can be used as an alternative method for the simultaneous analysis of rifampicin and isoniazid in combination preparations.

Keywords: rifampicin, isoniazid, TLC video densitometry, method validation, combination tablets.

Abstrak: Rifampisin dan isoniazid merupakan kombinasi obat antituberkulosis lini pertama yang banyak digunakan dalam terapi tuberkulosis. Penetapan kadar kedua senyawa secara simultan diperlukan untuk menjamin mutu dan keamanan sediaan farmasi. Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Video Densitometri sebagai alternatif analisis simultan rifampisin dan isoniazid dalam sediaan kombinasi tablet. Pemisahan dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak metanol:amonia (10:1). Visualisasi bercak dilakukan di bawah sinar UV 254 nm dan dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ untuk memperoleh nilai *area under curve* (AUC). Validasi metode meliputi selektivitas, linearitas, sensitivitas, akurasi, dan presisi. Hasil penelitian menunjukkan nilai R_f rifampisin sebesar 0,78 dan isoniazid sebesar 0,66 dengan faktor selektivitas 1,18. Kurva kalibrasi rifampisin dan isoniazid menunjukkan linearitas yang baik dengan koefisien determinasi masing-masing sebesar 0,9987 dan 0,9992. Nilai *recovery* rifampisin dan isoniazid berada pada rentang 99,20–99,70% dan 99,56–99,80%, sedangkan nilai %RSD masing-masing kurang dari 2%. Hasil penetapan kadar tablet kombinasi menunjukkan kadar rifampisin sebesar 82,42–82,46% dan isoniazid sebesar 78,46–78,48%. Berdasarkan hasil validasi, metode KLT video densitometri memenuhi parameter validasi dan dapat digunakan sebagai alternatif metode analisis simultan rifampisin dan isoniazid dalam sediaan kombinasi.

Kata kunci: rifampisin, isoniazid, KLT video densitometri, validasi metode, tablet kombinasi.

Fakultas Farmasi, Universitas
Bhakti Kencana, Jl. Soekarno
Hatta No 754 Bandung

Korespondensi:

Fauzan Zein Muttaqin
fauzanzein@bku.ac.id



Creative Commons Attribution-NonCommercial-
Share Alike 4.0 International License

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) masih menjadi salah satu penyakit infeksi dengan angka morbiditas dan mortalitas tinggi di dunia. World Health Organization (WHO) melaporkan bahwa TB tetap menjadi masalah kesehatan global yang memerlukan perhatian serius dalam pengendalian dan pengobatannya (1). Pengobatan TB umumnya menggunakan kombinasi beberapa obat antituberkulosis (OAT), diantaranya rifampisin dan isoniazid, yang termasuk obat lini pertama dan digunakan secara luas dalam terapi TB. Kombinasi kedua obat tersebut bertujuan meningkatkan efektivitas terapi dan menurunkan risiko resistensi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Oleh karena itu, mutu sediaan kombinasi rifampisin dan isoniazid perlu dijamin melalui pengujian kadar yang akurat, selektif, dan presisi.

Analisis kadar zat aktif dalam sediaan farmasi dapat dilakukan menggunakan berbagai metode instrumental, seperti spektrofotometri dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Metode KCKT diketahui memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi sehingga sering digunakan sebagai metode baku dalam analisis farmasi. Namun demikian, penggunaan KCKT memerlukan instrumen dengan biaya investasi dan operasional yang relatif tinggi, kebutuhan pelarut organik dalam jumlah besar, serta pemeliharaan instrumen yang tidak sederhana (2,3). Di sisi lain, metode spektrofotometri memiliki keterbatasan dalam analisis simultan senyawa multikomponen yang memiliki spektrum serapan saling tumpang tindih sehingga dapat menurunkan selektivitas analisis. Kondisi tersebut menunjukkan perlunya pengembangan metode alternatif yang lebih sederhana, ekonomis, namun tetap mampu memberikan performa analisis yang baik untuk pengawasan mutu sediaan kombinasi rifampisin-isoniazid. Salah satu metode yang berpotensi dikembangkan adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode KLT masih banyak digunakan karena sederhana, cepat, ekonomis, dan mampu menganalisis beberapa sampel secara simultan (4). Selain itu, KLT memiliki keunggulan berupa kebutuhan pelarut yang relatif sedikit, biaya operasional rendah, serta kemudahan pengoperasian dibandingkan metode

instrumental lainnya (5). Metode KLT juga telah berkembang menjadi teknik yang lebih modern melalui kombinasi dengan densitometri dan analisis citra digital sehingga meningkatkan sensitivitas dan kemampuan kuantifikasinya (4).

Hingga saat ini, sebagian besar penelitian analisis rifampisin-isoniazid masih berfokus pada penggunaan KCKT dan spektrofotometri, sedangkan pengembangan metode berbasis KLT-video densitometri dengan analisis citra digital untuk kedua senyawa tersebut belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu, terdapat kesenjangan metodologis berupa belum tersedianya metode alternatif yang sederhana, ekonomis, dan tervalidasi untuk analisis simultan rifampisin dan isoniazid menggunakan pendekatan video densitometri berbasis ImageJ. Penelitian ini memiliki kontribusi ilmiah dalam pengembangan metode KLT video densitometri sebagai alternatif analisis kuantitatif yang dapat diaplikasikan pada laboratorium dengan keterbatasan instrumen, namun tetap memenuhi parameter validasi analitik.

Perkembangan teknologi analisis citra pada KLT memungkinkan proses kuantifikasi dilakukan menggunakan perangkat lunak berbasis pengolahan gambar, seperti ImageJ (6). Pendekatan ini dinilai lebih sederhana dan ekonomis dibandingkan penggunaan densitometer konvensional. ImageJ merupakan perangkat lunak open-source yang mampu menganalisis intensitas bercak pada plat KLT melalui pengukuran integrated density atau *area under curve* (AUC), sehingga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif senyawa dalam sampel (7). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa analisis citra menggunakan ImageJ memiliki potensi yang baik dalam pengembangan fingerprint kromatogram dan analisis kuantitatif berbasis KLT (8). Selain itu, metode kombinasi KLT dan image analysis dilaporkan memiliki akurasi, reproduktibilitas, serta selektivitas yang baik untuk analisis senyawa aktif (9).

Penggunaan metode KLT video densitometri dalam analisis sediaan farmasi kombinasi telah banyak dikembangkan dan menunjukkan hasil validasi yang baik. Penelitian sebelumnya oleh Muttaqin dkk. melaporkan bahwa metode KLT video densitometri mampu digunakan untuk

penetapan kadar amoksisilin trihidrat dan kalium klavulanat secara simultan dalam sediaan kombinasi dengan parameter validasi yang memenuhi persyaratan, meliputi linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi, dan batas kuantitasi (10). Metode tersebut menggunakan analisis bercak berbasis citra digital melalui perangkat lunak ImageJ yang mampu menghasilkan nilai AUC secara akurat, serta menunjukkan bahwa KLT video densitometri memiliki potensi besar sebagai metode alternatif analisis kuantitatif yang sederhana, cepat, dan ekonomis untuk sediaan multi komponen (10).

Prinsip dasar video densitometri adalah pemindaian optik secara elektronik menggunakan kamera digital, sumber cahaya, dan perangkat lunak pengolah citra untuk menganalisis intensitas bercak pada plat KLT (11). Teknik ini memiliki beberapa keunggulan, antara lain proses akuisisi data yang cepat, desain instrumen sederhana, serta kompatibilitas dengan analisis data digital (10). Dengan perkembangan teknologi kamera digital dan perangkat lunak analisis citra, metode KLT video densitometri semakin berpotensi dikembangkan sebagai metode analisis alternatif dalam pengawasan mutu sediaan farmasi, khususnya untuk analisis simultan zat aktif dalam sediaan kombinasi.

Dalam pengembangan metode analisis, validasi metode merupakan tahapan penting untuk memastikan bahwa metode yang digunakan sesuai dengan tujuan analisis. Parameter validasi yang umum digunakan meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, batas deteksi, dan batas kuantitasi sebagaimana dijelaskan dalam pedoman ICH Q2(R1) (12). Validasi diperlukan untuk menjamin bahwa metode analisis memberikan hasil yang reliabel dan dapat dipertanggungjawabkan dalam pengujian mutu sediaan farmasi.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode KLT Video Densitometri sebagai alternatif analisis simultan rifampisin dan isoniazid dalam sediaan kombinasi tablet. Metode ini diharapkan dapat menjadi alternatif analisis yang sederhana, ekonomis, dan mampu

memberikan hasil yang valid dalam penetapan kadar rifampisin dan isoniazid secara simultan.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi baku pembanding rifampisin dan isoniazid standar bersertifikat, tablet kombinasi rifampisin-isoniazid yang diperoleh dari pasaran, metanol pro analysis, amonia, aquadest, serta bahan kimia lain berkualitas pro analysis. Plat KLT yang digunakan adalah silika gel GF254 aluminium sheet ukuran 20 × 20 cm (Merck, Jerman) sebagai fase diam.

Metode

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi chamber KLT kaca dengan penutup, mikropipet (Socorex®), pipa kapiler, lampu UV 254 nm, timbangan analitik (ketelitian 0,1 mg), vortex mixer, sonikator, oven pengering, gelas ukur, labu ukur, gelas beker, erlenmeyer, serta kamera digital mirrorless Sony Alpha A5100 dengan resolusi 24,3 MP yang dilengkapi tripod statis. Analisis citra dilakukan menggunakan perangkat lunak ImageJ versi 1.53 (6) pada komputer berbasis Windows 11.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang meliputi optimasi sistem KLT video densitometri, validasi metode analisis, dan penetapan kadar rifampisin serta isoniazid dalam sediaan kombinasi tablet.

1. Pembuatan Larutan Baku

Larutan baku rifampisin dan isoniazid dibuat dengan menimbang masing-masing baku pembanding secara seksama, kemudian dilarutkan menggunakan metanol hingga diperoleh konsentrasi tertentu. Larutan baku selanjutnya digunakan untuk optimasi sistem, pembuatan kurva kalibrasi, dan validasi metode.

2. Optimasi Sistem KLT

Optimasi dilakukan untuk memperoleh kondisi pemisahan terbaik antara rifampisin dan isoniazid. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF254, sedangkan fase gerak berupa campuran metanol:amonia (10:1). Larutan baku rifampisin dan isoniazid ditotolkan sebanyak 5 µL pada plat KLT menggunakan mikropipet dengan

volume tertentu, kemudian dikembangkan dalam chamber yang telah dijenhkan fase gerak.

Plat hasil elusi dikeringkan dan divisualisasikan di bawah lampu UV 254 nm. Citra bercak direkam menggunakan kamera digital dengan pengaturan intensitas cahaya yang konstan. Hasil perekaman kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ untuk memperoleh kromatogram dan nilai AUC.

3. Akuisisi Citra dan Analisis Video Densitometri

Visualisasi bercak dilakukan menggunakan lampu UV 254 nm. Plat KLT difoto menggunakan kamera digital mirrorless Sony Alpha A5100 dengan pengaturan berikut:

- ISO: 100
- Aperture: f/5.6
- Shutter speed: 1/60 detik
- White balance: daylight
- Format gambar: JPEG

Kamera diposisikan tegak lurus terhadap plat KLT menggunakan tripod statis dengan jarak tetap 30 cm dari permukaan plat. Intensitas pencahayaan dan posisi lampu UV dibuat konstan untuk seluruh proses pengambilan gambar guna menjaga konsistensi intensitas bercak.

Citra hasil kromatografi dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ versi 1.53. Analisis dilakukan dengan penentuan area bercak menggunakan rectangular selection tool, dan pengukuran integrated density untuk memperoleh nilai AUC. Parameter brightness dan contrast dijaga konstan pada seluruh analisis untuk menghindari variasi respon citra (6).

4. Validasi Metode Analisis

Validasi metode dilakukan berdasarkan parameter validasi ICH Q2(R1) (12), meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ), akurasi, dan presisi.

a. Selektivitas

Selektivitas ditentukan berdasarkan kemampuan metode memisahkan rifampisin dan isoniazid secara baik pada sistem kromatografi yang digunakan. Evaluasi dilakukan dengan membandingkan nilai R_f dan bentuk kromatogram masing-masing senyawa.

b. Linearitas

Linearitas ditentukan menggunakan serangkaian konsentrasi larutan baku rifampisin dan isoniazid. Setiap konsentrasi ditotolkan pada plat KLT, kemudian dilakukan analisis video densitometri menggunakan ImageJ untuk memperoleh nilai AUC. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot konsentrasi terhadap AUC, kemudian dihitung persamaan regresi linear dan koefisien determinasinya (R^2).

c. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Nilai LOD dan LOQ dihitung berdasarkan simpangan baku respon dan kemiringan kurva kalibrasi menggunakan persamaan regresi linear.

d. Akurasi

Akurasi ditentukan menggunakan metode recovery pada tiga tingkat konsentrasi, yaitu 80%, 100%, dan 120% dari kadar teoritis. Nilai recovery dihitung sebagai persentase perolehan kembali analit yang ditambahkan ke dalam sampel.

e. Presisi

Presisi ditentukan berdasarkan pengukuran berulang terhadap sampel pada konsentrasi tertentu dalam kondisi yang sama. Presisi dinyatakan sebagai nilai persen relative standard deviation (%RSD). Metode dinyatakan memenuhi syarat apabila nilai %RSD kurang dari 2%.

5. Penetapan Kadar Sampel

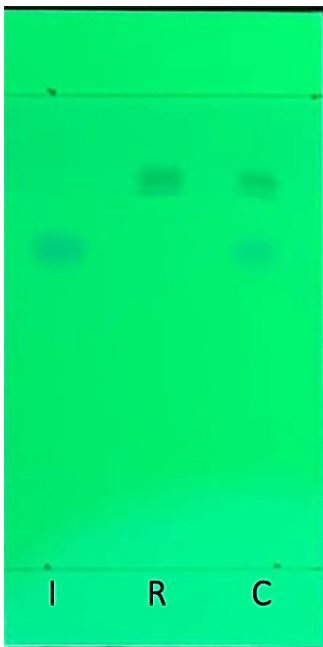
Tablet kombinasi rifampisin dan isoniazid ditimbang dan dihancurkan hingga homogen. Sejumlah serbuk setara kadar tertentu ditimbang, kemudian dilarutkan dalam metanol dan disonikasi hingga larut. Larutan disaring dan diencerkan hingga diperoleh konsentrasi yang sesuai dengan rentang linearitas metode.

Larutan sampel ditotolkan sebanyak 5 μ L pada plat KLT bersama larutan baku, kemudian dikembangkan menggunakan fase gerak optimum. Plat divisualisasikan di bawah UV 254 nm dan dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ untuk memperoleh nilai AUC. Kadar rifampisin dan isoniazid dalam sampel dihitung berdasarkan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi.

Hasil dan Diskusi

Optimasi Sistem KLT Video Densitometri

Optimasi sistem KLT video densitometri dilakukan untuk memperoleh kondisi pemisahan yang optimal antara rifampisin dan isoniazid. Pada penelitian ini digunakan fase diam berupa plat silika gel GF254 dan fase gerak metanol:amonia (10:1). Kombinasi fase gerak tersebut mampu menghasilkan pemisahan bercak yang baik dengan nilai R_f rifampisin sebesar 0,78 dan isoniazid sebesar 0,66. Nilai R_f yang berada pada rentang 0,2–0,8 menunjukkan bahwa sistem kromatografi telah memenuhi kriteria pemisahan yang baik sehingga bercak dapat diamati secara optimal tanpa gangguan front pelarut maupun tailing.

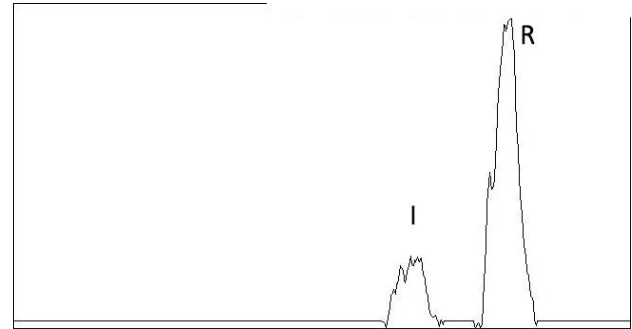


Gambar 1. Plat KLT hasil elusi dengan fase gerak metanol:amonia (10:1)

Keterangan: I = Isoniazid; R = Rifampisin; C = campuran Isoniazid dan Rifampisin

Visualisasi bercak dilakukan menggunakan sinar UV 254 nm dan direkam menggunakan kamera digital. Citra hasil kromatogram dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ untuk memperoleh profil densitogram dan nilai AUC. Penggunaan ImageJ sebagai perangkat lunak open-source memberikan keuntungan berupa biaya analisis yang lebih rendah dibandingkan

penggunaan densitometer konvensional. Sowers dkk. melaporkan bahwa kombinasi TLC dan analisis citra berbasis smartphone serta ImageJ mampu menghasilkan analisis kuantitatif yang baik dengan linearitas dan presisi yang tinggi.



Gambar 2. Kromatogram larutan baku campuran isoniazid dan rifampisin dengan fase gerak metanol:amonia 10:1

Keterangan: I = Isoniazid; R = Rifampisin

Perbedaan nilai R_f antara rifampisin dan isoniazid dipengaruhi oleh perbedaan polaritas kedua senyawa terhadap fase diam silika gel dan fase gerak yang digunakan. Rifampisin memiliki struktur yang lebih nonpolar dibandingkan isoniazid sehingga bergerak lebih jauh pada fase gerak dan menghasilkan nilai R_f lebih besar. Penambahan amonia dalam fase gerak juga membantu meningkatkan pemisahan dengan mengurangi interaksi senyawa yang bersifat basa dengan gugus silanol pada silika gel.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Parys dkk. yang menunjukkan bahwa kombinasi fase gerak yang sesuai mampu menghasilkan resolusi optimal pada analisis simultan senyawa dalam sediaan kombinasi, serta menyatakan bahwa metode KLT-densitometri memiliki kemampuan pemisahan yang baik terhadap senyawa aktif dan produk degradasinya dengan penggunaan fase gerak yang tepat (13).

Selektivitas

Selektivitas merupakan parameter validasi yang menunjukkan kemampuan metode analisis dalam mengukur analit secara spesifik di tengah keberadaan komponen lain seperti eksipien, pengotor, pelarut, maupun produk degradasi. Pada penelitian ini, selektivitas metode KLT video densitometri dievaluasi berdasarkan

kemampuan sistem kromatografi dalam memisahkan rifampisin dan isoniazid secara jelas pada plat KLT.

Tabel 1. Hasil Uji Selektivitas

Analit	Jarak migrasi Analit	Jarak migrasi fase gerak	Nilai Rf	Nilai Alfa
Rifampisin	4,7 cm	6 cm	0,78	1,18
Isoniazid	4,5 cm	6 cm	0,66	

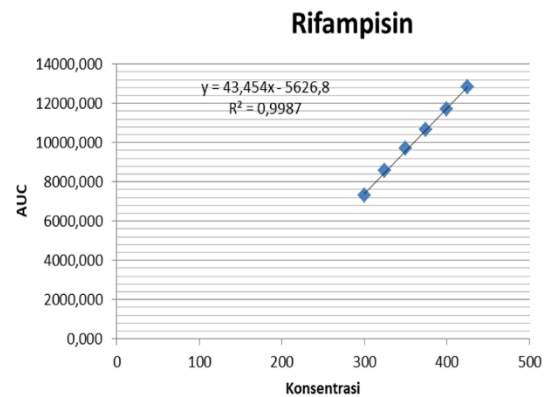
Hasil penelitian menunjukkan bahwa rifampisin dan isoniazid menghasilkan bercak yang terpisah dengan baik menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak metanol:amonia (10:1). Rifampisin memiliki nilai Rf sebesar 0,78 sedangkan isoniazid sebesar 0,66. Perbedaan nilai Rf tersebut menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak sehingga tidak terjadi overlapping bercak selama proses elusi. Selain itu, nilai faktor selektivitas (α) sebesar 1,18 menunjukkan bahwa sistem kromatografi mampu memberikan pemisahan yang selektif karena nilai α lebih besar dari 1.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Sakunpak dkk. yang pada analisis γ -oryzanol menggunakan TLC-image analysis juga menunjukkan bahwa metode berbasis analisis citra digital mampu menghasilkan pemisahan dan identifikasi bercak yang baik untuk analisis kuantitatif senyawa dalam sampel kompleks (9). Penelitian tersebut menegaskan bahwa penggunaan perangkat lunak analisis citra dapat mendukung peningkatan kemampuan selektivitas pada metode KLT modern.

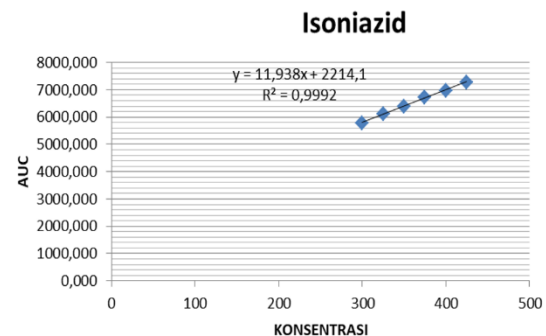
Dengan demikian, hasil uji selektivitas pada penelitian ini menunjukkan bahwa metode KLT video densitometri mampu memberikan respon yang spesifik terhadap rifampisin dan isoniazid tanpa adanya interferensi dari komponen lain dalam matriks tablet. Hal ini membuktikan bahwa metode yang dikembangkan memenuhi parameter selektivitas dan layak digunakan untuk analisis simultan rifampisin dan isoniazid dalam sediaan kombinasi.

Linieritas

Linearitas metode dievaluasi melalui hubungan antara konsentrasi larutan baku dengan nilai AUC hasil analisis densitometri menggunakan ImageJ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rifampisin memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9987 sedangkan isoniazid sebesar 0,9992. Nilai koefisien determinasi yang mendekati satu menunjukkan adanya hubungan linear yang sangat baik antara konsentrasi analit dan respon densitometri. Hal ini menunjukkan bahwa metode mampu memberikan respon proporsional terhadap peningkatan konsentrasi analit.



Gambar 3. Kurva kalibrasi rifampisin



Gambar 3. Kurva kalibrasi isoniazid

Hasil penelitian ini sesuai dengan pedoman ICH Q2(R1) yang menyatakan bahwa metode analisis kuantitatif harus memiliki linearitas yang baik dalam rentang konsentrasi tertentu (14). Penelitian Muttaqin dkk. juga melaporkan linearitas yang baik dengan metode berbasis analisis citra digital dengan nilai koefisien

korelasi sebesar 0,9992 dan 0,9994 pada analisis amoksisilin trihidrat dan kalium klavulanat. (10).

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Dari kurva kalibrasi rifampisin dan isoniazid diperoleh nilai batas deteksi rifampisin dan isoniazid berturut-turut sebesar 5,635 ug/ml dan 4,307 ug/ml, serta nilai batas kuantitasi rifampisin dan isoniazid berturut-turut sebesar 18,783 ug/ml dan 14,357 ug/ml. Hal ini menunjukkan sensitivitas metode dalam mendeteksi dan mengkuantifikasi analit pada konsentrasi rendah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode KLT video densitometri memiliki sensitivitas yang memadai untuk analisis rifampisin dan isoniazid.

Sensitivitas metode dipengaruhi oleh kualitas visualisasi bercak, kemampuan kamera dalam menangkap intensitas cahaya, serta kemampuan perangkat lunak ImageJ dalam menganalisis densitas piksel bercak. Penggunaan kamera digital dengan pencahayaan konstan membantu meningkatkan kualitas citra sehingga proses kuantifikasi dapat dilakukan secara optimal. Hasil ini sejalan dengan penelitian Sowers dkk. yang menyatakan bahwa kombinasi TLC dan analisis citra digital mampu memberikan sensitivitas yang baik untuk analisis senyawa farmasi menggunakan perangkat sederhana dan biaya rendah (7).

Akurasi

Akurasi metode ditentukan berdasarkan nilai recovery pada tingkat konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa recovery rifampisin berada pada rentang 99,20–99,70%, sedangkan isoniazid berada pada rentang 99,56–99,80%.

Nilai recovery yang berada pada rentang 98–102% menunjukkan bahwa metode memiliki tingkat ketepatan yang baik dalam menentukan kadar analit. Tingginya nilai recovery menunjukkan bahwa metode mampu mengukur kadar rifampisin dan isoniazid tanpa dipengaruhi secara signifikan oleh matriks sampel maupun kehilangan analit selama proses analisis (15).

Tabel 2. Hasil Uji Akurasi Rifampisin

Level	Replikasi	Kadar teoritis (mg)	Kadar hitung (mg)	Rata-rata % Recovery
80%	I	120	118,52	99,20%
	II	120	118,72	
	III	120	119,87	
100%	I	150	149,5	99,66%
	II	150	149,2	
	III	150	149,79	
120%	I	180	178,62	99,70%
	II	180	179,93	
	III	180	179,81	

Tabel 3. Hasil Uji Akurasi Isoniazid

Level	Replikasi	Kadar teoritis (mg)	Kadar hitung (mg)	Rata-rata % Recovery
80%	I	120	119,88	99,80%
	II	120	119,76	
	III	120	119,64	
100%	I	150	149,58	99,72%
	II	150	149,65	
	III	150	149,6	
120%	I	180	179,14	99,56%
	II	180	179,2	
	III	180	179,28	

Presisi

Presisi metode menunjukkan tingkat kedekatan hasil pengukuran antara satu pengukuran dengan pengukuran lainnya pada kondisi yang sama. Parameter ini menggambarkan keterulangan (repeatability) dan ketahanan metode terhadap variasi analisis selama penggunaan rutin. Pada penelitian ini, uji presisi dilakukan dalam bentuk intermediate precision (presisi antara) dengan pengukuran selama 3 hari berturut-turut dan masing-masing dilakukan sebanyak 6 kali replikasi. Presisi metode dinyatakan sebagai nilai persen relative standard deviation (%RSD) dari pengukuran berulang (16).

Tabel 4. Hasil Uji Preisi Rifampisin

Hari ke:	Replikasi	Kadar hitung (mg)
1	1	149,86
	2	149,82
	3	149,7
	4	149,86
	5	149,97
	6	149,97
2	1	149,94
	2	149,9
	3	149,26
	4	149,93
	5	149,94
	6	149,92
3	1	149,41
	2	149,83
	3	149,25
	4	149,67
	5	149,94
	6	149,37

Keterangan: SD = 0,25 ; RSD = 0,17%

Tabel 5. Hasil Uji Presisi Isoniazid

Hari ke:	Replikasi	Kadar hitung (mg)
1	1	149,69
	2	149,66
	3	149,32
	4	149,35
	5	149,7
	6	149,59
2	1	149,39
	2	149,54
	3	149,77
	4	149,67
	5	149,61
	6	149,61
3	1	149,92
	2	149,93
	3	149,7
	4	149,71
	5	149,94
	6	149,53

Keterangan: SD = 0,18 ; RSD = 0,12%

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai %RSD rifampisin dan isoniazid berturut-turut sebesar 0,17% dan 0,12%.

Nilai %RSD yang rendah menunjukkan bahwa metode memiliki keterulangan dan kestabilan yang baik meskipun pengukuran dilakukan pada hari yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa metode KLT video densitometri mampu menghasilkan data yang konsisten dan reproducible dalam penggunaan rutin laboratorium. Intermediate precision menjadi parameter penting karena dapat menggambarkan pengaruh variasi kondisi analisis harian, seperti perubahan suhu ruang, kelembaban, intensitas lampu UV, proses pengembangan plat KLT, maupun variasi kecil pada proses penotolan sampel. Meskipun terdapat potensi variasi antar hari, metode yang dikembangkan tetap mampu memberikan hasil analisis yang stabil (17).

Presisi yang baik menunjukkan bahwa faktor-faktor seperti penotolan sampel, pengembangan plat, visualisasi bercak, dan analisis citra dapat dilakukan secara stabil dan reproducible. Hasil ini sesuai dengan persyaratan validasi metode analisis menurut ICH yang menyatakan bahwa nilai %RSD untuk analisis kuantitatif sebaiknya kurang dari 2% (14,17).

Dengan demikian, hasil uji presisi pada penelitian ini menunjukkan bahwa metode KLT video densitometri memiliki keterulangan dan kestabilan yang baik untuk analisis simultan rifampisin dan isoniazid. Hal ini membuktikan bahwa metode yang dikembangkan layak digunakan sebagai metode analisis kuantitatif dalam pengawasan mutu sediaan farmasi kombinasi.

Penetapan Kadar Rifampisin dan Isoniazid dalam Tablet Kombinasi

Metode KLT video densitometri yang telah tervalidasi selanjutnya digunakan untuk penetapan kadar rifampisin dan isoniazid dalam sediaan tablet kombinasi yang beredar di pasaran. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar rifampisin berada pada rentang 82,42–82,46%, sedangkan kadar isoniazid berada pada rentang 78,46–78,48% terhadap kadar yang tertera pada etiket.

Tabel 6. Hasil Penetapan Rifampisin dan Isoniazid dalam Tablet Kombinasi

Replikasi	Kadar Rifampisin (%)	Kadar Isoniazid (%)
I	82,42%	78,47%
II	82,46%	78,46%
III	82,43%	78,48%
Rata-rata ± SD	82,42% ± 0,25	78,47% ± 0,18

Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar kedua zat aktif berada di bawah persyaratan kadar yang umumnya ditetapkan dalam farmakope, yaitu berkisar 90–110% dari kadar tertera. Rendahnya kadar rifampisin dan isoniazid dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti degradasi selama penyimpanan, paparan suhu dan kelembaban, maupun ketidakstabilan formulasi.

Rifampisin diketahui memiliki stabilitas yang relatif rendah dan mudah mengalami degradasi terutama pada kondisi lembab dan suhu tinggi. Selain itu, interaksi rifampisin dengan isoniazid dalam sediaan kombinasi juga dapat menyebabkan penurunan stabilitas rifampisin selama penyimpanan. Fenomena ini telah banyak dilaporkan pada sediaan fixed dose combination antituberkulosis. Beberapa penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa sediaan kombinasi rifampisin–isoniazid memiliki permasalahan stabilitas yang lebih kompleks dibandingkan sediaan tunggal. Singh dkk. menyatakan bahwa rifampisin dapat mengalami degradasi lebih cepat pada formulasi kombinasi akibat interaksi dengan isoniazid, terutama pada kondisi kelembaban dan temperatur tinggi (18). Stabilitas rifampisin dalam sediaan kombinasi sangat dipengaruhi oleh kondisi penyimpanan dan jenis kemasan yang digunakan, dimana penggunaan kemasan dengan sifat penghalang (barrier packaging) berperan penting dalam mempertahankan kestabilan zat aktif selama penyimpanan (19).

Secara keseluruhan, metode KLT video densitometri yang dikembangkan mampu

digunakan untuk analisis simultan rifampisin dan isoniazid dengan parameter validasi yang memenuhi persyaratan. Metode ini memiliki beberapa keunggulan, yaitu sederhana, ekonomis, cepat, menggunakan pelarut dalam jumlah sedikit, dan mampu menghasilkan analisis kuantitatif yang baik sehingga berpotensi digunakan sebagai alternatif metode analisis dalam pengawasan mutu sediaan farmasi kombinasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Video Densitometri menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak metanol:amonia (10:1) dapat digunakan untuk analisis simultan rifampisin dan isoniazid dalam sediaan kombinasi tablet. Sistem kromatografi menghasilkan pemisahan yang baik dengan nilai Rf rifampisin sebesar 0,78 dan isoniazid sebesar 0,66 serta memenuhi parameter selektivitas.

Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode KLT video densitometri memenuhi parameter validasi berdasarkan pedoman ICH Q2(R1), meliputi selektivitas, linearitas, sensitivitas, akurasi, dan presisi. Nilai koefisien determinasi (R^2) rifampisin dan isoniazid masing-masing sebesar 0,9987 dan 0,9992, nilai recovery berada pada rentang 99,20–99,80%, serta nilai %RSD kurang dari 2%, sehingga menunjukkan bahwa metode memiliki ketepatan dan keterulangan yang baik.

Metode yang telah tervalidasi selanjutnya digunakan untuk penetapan kadar rifampisin dan isoniazid dalam sediaan tablet kombinasi yang beredar di pasaran. Hasil analisis menunjukkan kadar rifampisin sebesar 82,42–82,46% dan isoniazid sebesar 78,46–78,48% terhadap kadar yang tertera pada etiket. Penerapan metode pada sampel tablet kombinasi menunjukkan kadar rifampisin dan isoniazid berada di bawah rentang spesifikasi yang dipersyaratkan. Namun demikian, hasil tersebut perlu diinterpretasikan secara hati-hati karena penelitian ini tidak mencakup evaluasi stabilitas, identifikasi produk degradasi, maupun penelusuran kondisi penyimpanan dan distribusi sampel yang diuji.

Dengan demikian, metode KLT video densitometri dapat digunakan sebagai alternatif metode analisis simultan rifampisin dan isoniazid yang sederhana, cepat, ekonomis, dan mampu memberikan hasil analisis kuantitatif yang baik dalam pengawasan mutu sediaan farmasi kombinasi.

Referensi

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2023. World Health Organization; 2023.
2. Teknologi J, Khoiri S, Martono S, Rohman A. OPTIMISATION AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF RIFAMPICIN, ISONIAZID, PYRAZINAMIDE, AND ETHAMBUTOL HYDROCHLORIDE IN ANTI-TUBERCULOSIS 4-FDC TABLET [Internet]. Vol. 77. 2015. Available from: www.jurnalteknologi.utm.my
3. Chellini PR, Lages EB, Franco PHC, Nogueira FHA, César IC, Pianetti GA. Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamide, and Ethambutol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations. *J AOAC Int.* 2015 Sep 1;98(5):1234–9. doi:10.5740/jaoacint.14-237
4. Ahmed O, Rasheed A. ADVANCEMENTS IN THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY: A COMPREHENSIVE EXPLORATION. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences.* 2024;10. doi:10.1044/1980
5. Parys W, Pyka-Pajak A, Dołowy M. Application of thin-layer chromatography in combination with densitometry for the determination of diclofenacin enteric coated tablets. *Pharmaceuticals.* 2019 Dec 1;12(4). doi:10.3390/ph12040183
6. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul 28;9(7):671–5. doi:10.1038/nmeth.2089
7. Sowers ME, Ambrose R, Bethea E, Harmon C, Jenkins D. Quantitative thin layer chromatography for the determination of medroxyprogesterone acetate using a smartphone and open-source image analysis. *J Chromatogr A.* 2022 Apr 26;1669. doi:10.1016/j.chroma.2022.462942 PubMed PMID: 35305455.
8. Mirayanti NPD, Yustiantara PS, Wirasuta IMAG. IMPLEMENTATION OF IMAGE ANALYSIS FROM THIN LAYER CHROMATOGRAM OF PURPLE SWEET POTATO LEAF EXTRACT IN CHEMICAL FINGERPRINTING. *Journal of Pharmaceutical Science and Application.* 2023 Dec 26;5(2):59. doi:10.24843/jpsa.2023.v05.i02.p01
9. Sakunpak A, Suksaeree J, Monton C, Pathompak P, Kraisintu K. Quantitative analysis of γ -oryzanol content in cold pressed rice bran oil by TLC-image analysis method. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;4(2):119–23. doi:10.1016/S2221-1691(14)60219-7
10. Muttaqin FZ, Emawati E, Elfira HW. Simultaneous Determination of Amoxicillin Trihydrate and Potassium Clavulanate Levels in Combination Drug Preparations Using Video-Densitometric Thin Layer Chromatography Method. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications.* 2022;7:236. doi:10.35629/7781-0701236242
11. Muttaqin FZ, Yuliantini A, Fitriawati A, Asnawi A. PENETAPAN KADAR SENYAWA METAMPIRON DAN DIAZEPAM DALAM SEDIAAN KOMBINASI OBAT MENGGUNAKAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI DETERMINATION OF METHAMPYRON AND DIAZEPAM IN COMBINATION DOSAGE FORMS USING TLC VIDEO DENSITOMETRY METHOD. *PHARMACY.* 2016;13(2).
12. Shrivastava S, Deshpande P, Daharwal SJ. Key Aspects of Analytical Method Development and Validation. *Journal of Ravishankar University (PART-B).* 2019 Sep 21;31(1):32–9. doi:10.52228/JRUB.2018-31-1-6
13. Parys W, Pyka-Pajak A, Dołowy M. Application of Thin-Layer Chromatography in Combination with Densitometry for the Determination of Diclofenac in Enteric Coated Tablets. *Pharmaceuticals.* 2019 Dec 16;12(4):183. doi:10.3390/ph12040183

14. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. 1995. Available from: <http://www.emea.eu.int>
15. González AG, Herrador MÁ. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2007 Mar;26(3):227–38. doi:10.1016/j.trac.2007.01.009
16. Schwartz ME, Krull IS. *Handbook of Analytical Validation*. Boca Raton; 2012.
17. Chavan SD, Desai DM. Analytical method validation: A brief review. *World Journal of Advanced Research and Reviews*. 2022 Nov 30;16(2):389–402. doi:10.30574/wjarr.2022.16.2.1165
18. Singh S, Mariappan TT, Shankar R, Sarda N, Singh B. A critical review of the probable reasons for the poor variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *Int J Pharm*. 2001 Oct;228(1–2):5–17. doi:10.1016/S0378-5173(01)00754-2
19. Bhutani H, Mariappan TT, Singh S. The physical and chemical stability of anti-tuberculosis fixed-dose combination products under accelerated climatic conditions. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(9):1073–80.