

VALIDASI METODE ANALISIS KAPSUL RIFAMPISIN DENGAN HPLC-PDA**VALIDATION OF ANALYSIS METHODS OF RIFAMPICIN CAPSULES BY HPLC-PDA****Andi Suhendi^{1*}, Erya Ayusari Ramly¹**

Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta

Naskah diterima tanggal 26 Maret 2021

ABSTRACT

Rifampicin is one of the anti-tuberculosis drugs. HPLC is the method of choice because of its sensitivity, reproducibility and specificity. However, the latest method of liquid chromatography requires the addition of tetra-butyl ammonium hydroxide which can reduce the lifetime of column. This study was aim to developed a liquid chromatography method with efficient time consuming compared to previous methods. Rifampicin was analyzed by HPLC Alliance 2695 by WATERS and C18 column at room temperature. Gradient system mobile phase as acetonitrile and water at flow rate of 1.0 mL/min and detected with PDA detector at 254 nm. The result showed that %recovery was $99.96 \pm 0.04\%$ and $RSD 0.64 \pm 0.30\%$. Linearity achieved with coefficient correlation value of 0.998. Inter and intra-day precision value were 1.54 and 1.51%. LOQ value of 0.0164%, based on statistical method. Accurate, precise and linear parameters of RP-HPLC method developed was meet the requirement.

Keywords: RP-HPLC, Validation method, Rifampicin**ABSTRAK**

Rifampisin merupakan salah satu obat anti-tuberkulosis. HPLC merupakan metode pilihan karena kepekaan, reproduibilitas dan spesifitasnya. Namun metode terbaru dari kromatografi cair membutuhkan penambahan *tetra-butyl ammonium hydroxide* yang dapat memperpendek umur kolom. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan suatu metode kromatografi cair dengan waktu pengerjaan yang efisien dibandingkan metode-metode sebelumnya. Sistem kromatografi yaitu HPLC Alliance 2695, C18 (100 x 4,6 mm; 5 µm), fase gerak sistem *gradient* berupa asetone nitril dan akuades dengan laju alir 1,0 mL/menit dan dideteksi pada 254 nm. Hasil penetapan parameter validasi didapatkan bahwa metode akurat dengan %recovery $99,96 \pm 0,04\%$ dan $RSD 0,64 \pm 0,30\%$. Parameter linieritas didapatkan koefisien korelasi 0,998, kerberulangan dan presisi antara didapatkan RSD masing-masing yaitu 1,51% dan 1,54%. Nilai LoQ didapatkan dari persamaan regresi linier residual yaitu 0,0164%. Metode yang divalidasi memenuhi parameter validasi akurasi, presisi dan linieritas.

Kata Kunci: RP-HPLC, Validasi Metode, Rifampisin**PENDAHULUAN**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang menjadi penyebab utama kesehatan yang buruk, salah satu dari 10 penyebab utama kematian di seluruh dunia dan disebabkan oleh satu agen infeksi. Tuberkulosis disebabkan oleh bacillus *Mycobacterium tuberculosis*, yang menyebar ketika orang yang sakit TB mengeluarkan bakteri ke udara; misalnya batuk (World Health Organization, 2019). Data Kementerian Kesehatan RI

menunjukkan bahwa jumlah penderita TB di indoneisa cukup besar dengan jumiah kasus baru TB tahun 2016 sebesar 156.723 orang. Kasus TB baru yang dilaporkan pada tahun 2015 untuk provinsi Jawa Tengah adalah sebesar 11,7%. Oleh karena itu perlu ditetapkan strategi baru yang lebih komprehensif bagi pengendalian TB secara global (Kemenkes RI, 2017). Salah satu obat yang direkomendasikan dalam bentuk kommbinsdi dosis tetap yaitu rifampisin (World Health Organization, 2017). Obat itu merupakan derivat semisintetik rifamisin B yaitu salah satu anggota kelompok antibiotik makrosiklik. Obat ini merupakan ion zwitter, larut dalam pelarut

Alamat korespondensi :
Andi.Suhendi@ums.ac.id

organik dan air yang pH nya asam (Brunton et al., 2017). Rifampisin memiliki spektrum aksi bakterisidal yang luas, bekerja pada sintesis asam nukleat menghambat aktivitas enzim RNA tergantung DNA polimerase, dan membentuk kompleks yang stabil (Oliveira et al., 2018).

Berbagai metode analitik dilaporkan untuk penetapan isoniazid, rifampisin dan pirazinamid secara individual dan dalam campuran. Metode yang umum digunakan untuk penetapan dalam campuran yaitu berdasarkan spektrofotometri (Asadpour-Zeynali and Saeb, 2016; Benetton et al., 1998) atau HPLC (Allanson et al., 2007; Goutal et al., 2016; Shah and Jasani, 2014) (Khuhawar and Rind, 2002). HPLC adalah metode pilihan untuk analisis sediaan farmasi karena kepekaan, reproduibilitas dan spesifitasnya. Beberapa masalah yang perlu diperhatikan terkait optimasi kondisi kromatografi yaitu pemilihan jenis kolom, suhu kolom, komposisi fase gerak, pemilihan panjang gelombang spesifik dan volume injeksi. Namun selain fakta tersebut, metode ini dapat memberikan penentuan yang lebih spesifik dari pada metode spektrofotometri (Khatak et al., 2018).

Metode analisis untuk penetapan kadar rifampisin dengan HPLC ditemukan dalam *United States Pharmacopeia* (USP) (United States Pharmacopeia, 2018) dan Farmakope Indonesia (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014). Penelitian lain yang menggunakan HPLC fase terbalik untuk penetapan kadar rifampisin membutuhkan suatu internal standar dan *tetra-butyl ammonium hydroxide* sebagai agen pasangan ion dalam fase gerak yang memperpendek umur kolom (Calleri et al., 2002)

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan metode analisis penetapan kadar kapsul rifampisin yang lebih mudah dan unggul dibandingkan metode-metode sebelumnya. Selain itu, penelitian ini juga dilakukan untuk mengetahui validitas dari penetapan kadar rifampisin menggunakan metode HPLC-PDA.

METODE PENELITIAN

Alat

HPLC Alliance 2695 (Waters), kolom Knauer C18 (100 x 4,6 mm; 5 µm) dan Empower Software.

Bahan

Standar Rifampisin (LKT Labs, USA), kapsul Rifampisin 450 mg (PT. Indofarma), metanol (LC grade, Merck), asetonitril (LC grade, Merck) dan akuades (PT. Ikapharmindo Putramas).

Sistem Pemisahan

Analisis HPLC dilakukan menggunakan HPLC Alliance 2695 (Waters yang dilengkapi dengan autosampler dan detektor PDA). Pemisahan menggunakan kolom Knauer C18 (100 x 4,6 mm; 5 µm). Deteksi dilakukan pada Panjang gelombang 254 nm. Akuades (komponen fase gerak A) dan asetonitril (komponen fase gerak B). Elusi gradien dilakukan sebagai berikut: 95% fase gerak A pada menit ke 0, kemudian fase gerak B dinaikkan hingga 50% dalam 5 menit, pada menit 5,01 fase gerak A dinaikkan menjadi 95% hingga menit ke 10 dengan kecepatan 1,0 mL/ menit dan volume injeksi 10 µL.

Metode

1. Pembuatan Stok

Stok Rifampisin dibuat dengan menimbang seksama 50,0 mg Rifampisin dan dilarutkan dalam metanol sampai volume 10,0 mL, didapatkan konsentrasi 5 mg/mL atau 0,5% b/v.

2. Penetapan Kurva Baku

Diambil larutan stok Rifampisin dan dilarutkan dalam asetonitril hingga lima konsentrasi yaitu: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 dan 0,25%. Larutan uji disaring dengan filter 0,45 µm sebelum dibaca. Pembuatan larutan uji direplikasi tiga kali. Kurva kalibrasi diplot dari konsentrasi *versus* area.

3. Penetapan Keberulangan dan Presisi Antara

Sampel ditimbang seksama sebanyak 26,94 mg dan dilarutkan dalam metanol ad 5,0 mL. Diambil 0,3 mL larutan sampel dan ditambahkan 0,7 mL fase gerak asetonitril kemudian disaring dengan filter 0,45 µm untuk diinjeksikan. Sampel keberulangan direplikasi sebanyak 6 kali dan dibaca pada hari yang sama. Sampel presisi antara dibaca selama 3 hari berturut-turut. Hasil kadar terhitung digunakan untuk menghitung % RSD.

4. Penetapan Linearitas

Parameter linearitas dilakukan sebanyak tujuh titik konsentrasi antara 70% - 130%. Sampel ditimbang sesuai Tabel 1 dan dilarutkan dalam metanol ad 5,0 mL. Sampel diencerkan sebanyak 4x dan disaring dengan filter 0,45 µm sebelum dibaca. Larutan uji direplikasi tiga kali. Hasil linearitas diperoleh dari plot antara kadar teoritis vs kadar terhitung.

5. Penetapan Akurasi

Parameter akurasi dilakukan dengan menambahkan 80%, 100%, dan 120% zat aktif rifampisin dalam sampel Tabel 2. Konsentrasi larutan stok yang digunakan yaitu 3%. Larutan uji diencerkan 5 kali dan disaring dengan filter 0,45 µm sebelum dibaca. Dilakukan replikasi larutan uji sebanyak 3 kali. Kadar terhitung digunakan untuk menetapkan % *recovery* dan *RSD*.

Tabel 1. Penimbangan sampel parameter linearitas

Konsentrasi sampel	Berat sampel (gram)	Berat sampel yang ditimbang (gram)
70%	0,3395	0,01698
80%	0,3880	0,01939
90%	0,4365	0,02183
100%	0,4850	0,02425
110%	0,5335	0,02665
120%	0,5820	0,02912
130%	0,6305	0,03151

Tabel 2. Penambahan zat aktif parameter akurasi

Kelompok	Jumlah larutan stok yang diambil (mL)	Konsentrasi zat (% b/v)	Penambahan zat aktif (% b/v)
Sampel	-	-	-
Sampel + zat aktif 80%	0,6		0,36
Sampel + zat aktif 100%	0,75	0,45	0,45
Sampel + zat aktif 120%	0,9		0,54

6. Penetapan *Limit of Quantitation (LoQ)*
Limit of Quantitation (LoQ) dihitung berdasarkan persamaan pada ICH *guidelines*. LOQ dihitung sebagai 10 dikalikan dengan SD dari nilai respon kemudian dibagi dengan nilai slope dari kurva kalibrasi.

$$QL = \frac{10 \sigma}{s} \dots \dots \dots (1)$$

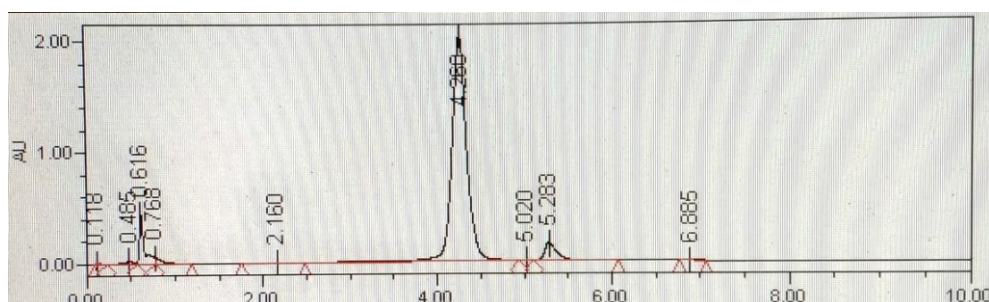
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan dalam HPLC fase terbalik salah satu komponen fase gerak adalah dapar. Penelitian ini juga awalnya menggunakan dapar untuk melakukan pemisahan rifampisin. Dapar yang umum digunakan dalam HPLC adalah dapar fosfat, karena asam fosfat memiliki tiga hidrogen terionisasi. Dapar fosfat membuat sistem buffer yang efektif pada nilai pH sekitar 2, 7 dan 10. Asetonitril digunakan karena kekuatan eluotropiknya yang kuat, viskositas rendah yang mengarah pada efisiensi kolom yang tinggi, dan transparansi UV yang baik (Dong and Boyes, 2018). Kelarutan buffer dalam pelarut organik perlu diperhatikan pada pemisahan sistem RP-HPLC untuk menghindari presipitasi garam dapar

(Schellinger and Carr, 2014).

Pemisahan dengan fase gerak tersebut mengakibatkan rifampisin terdeteksi pada menit ke 6,9 namun tidak sepenuhnya terelusi. Waktu retensi solute dipengaruhi oleh pH eluen yang mempengaruhi tingkat disosiasi analit (Shabir et al., 2007). Terdapat lebih dari dua puncak yang tidak simetris, tidak tajam dan *tailing* pada kedua sisi puncak. Puncak yang tidak tajam mungkin disebabkan oleh jumlah asetonitril yang sedikit. Penggunaan asetonitril dalam jumlah yang besar dapat menghasilkan puncak yang tajam, lebih simetris dan resolusi yang lebih baik (Vella et al., 2014).

Penggunaan buffer pada kolom silika merupakan penyebab utama terjadinya *tailing* pada puncak. Pada silika dengan kemurnian yang rendah, pKa kelompok silanol berada pada daerah pH 4-5. Artinya pada pH > 6 ionisasi silanol yang signifikan dapat terjadi (Dolan, 2006)(Dolan, n.d.). Sistem kombinasi fase gerak yang digunakan yaitu sistem gradient dengan persentase pada Tabel 3. Sistem ini memberikan puncak yang simetris, tajam dan tidak terjadi *tailing* pada Gambar 1 dimana rifampisin terdeteksi pada menit ke 4,246 ± 0,03.

**Gambar 1. Kromatogram Rifampisin konsentrasi 0,15% b/v**

Tabel 3. Kombinasi fase gerak sistem gradient dengan deteksi pada 254

Waktu (menit)	Laju Alir (mL/menit)	% Aquadest	% Asetonitril
0,00	1,00	95,0	5,0
5,00	1,00	50,0	50,0
15,00	1,00	95,0	5,0

Tabel 4. Hasil keberulangan Rifampisin

Kadar Teoritis (% b/v)	Kadar (% b/v)	SD	% RSD
0,15	0,1526	0,0023	1,5120
	0,1469		
	0,1504		
	0,1534		
	0,1520		
	0,1534		
Rata-rata	0,1515		

Kurva Baku

Kurva baku ditetapkan sebanyak lima titik sehingga didapatkan kurva baku Rifampisin dengan persamaan regresi linear yaitu $y = 165087176x + 900027$ dan nilai r yaitu 0,9998. Koefisien korelasi mendekati satu ($r = 1$) dianggap cukup oleh beberapa peneliti untuk menyimpulkan bahwa kurva kalibrasi linier (Moosavi and Ghassabian, 2018). Grafik hubungan antara kadar dan luas area dapat dilihat pada Gambar 2.

Presisi (Keberulangan dan Presisi Antara)

Presisi metode analitik menggambarkan kedekatan ukuran analit individu yang berulang (European Medicines Agency, 2011). Keberulangan memperoleh % RSD yaitu 1,5% dimana nilai ini memenuhi syarat keberterimaan yaitu % RSD $\leq 2\%$ (Food and Drug Administration, 2014). Hasil keberulangan rifampisin dapat dilihat pada Tabel 4. Presisi antara memperoleh % RSD yaitu 1,5% dimana nilai ini memenuhi syarat keberterimaan yaitu % RSD $\leq 2\%$ (Food and Drug Administration,

2014). Hasil presisi antara dapat dilihat pada Tabel 5.

Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode untuk memberikan sinyal yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam sampel. Syarat keberterimaan linearitas yaitu memiliki nilai $r^2 \geq 0,995$ (Food and Drug Administration, 2014). Linearitas memperoleh persamaan regresi linear yaitu $y = 1,08968254x - 0,035928571$ dengan nilai r^2 yaitu 0,9983. Grafik hubungan antara kadar teoritis vs kadar terhitung dapat dilihat pada Gambar 3.

Akurasi

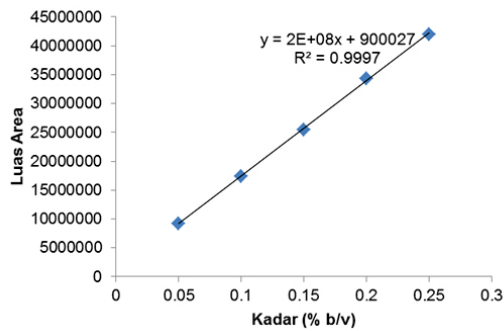
Akurasi metode menggambarkan kedekatan nilai yang ditetapkan dengan nilai sebenarnya (European Medicines Agency, 2011). Syarat keberterimaan untuk parameter akurasi yaitu memiliki nilai % *recovery* 97,0% - 103,0% (Food and Drug Administration, 2014). Data hasil akurasi sampel rifampisin dapat dilihat pada Tabel 6. Larutan sampel dengan penambahan

Tabel 5. Hasil presisi antara Rifampisin

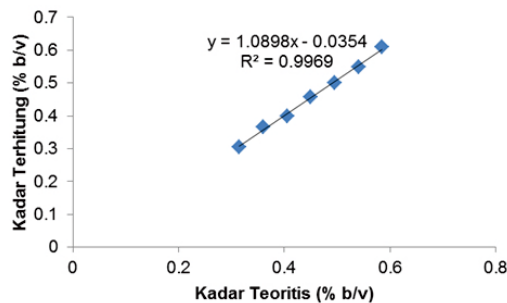
Hari ke-	Kadar teoritis (% b/v)	Kadar (% b/v)	Rata-rata kadar (% b/v)	% RSD
1	0,15	0,1579	0,1592 \pm 0,0025	1,5425
2		0,1620		
3		0,1577		

Tabel 6. Akurasi sampel rifampisin

Kelompok	Kadar (% b/v)	% Recovery	% RSD
Sampel	0,44 \pm 0,01	-	-
Sampel + zat aktif 80%	0,80 \pm 0,01	99,91	0,65
Sampel + zat aktif 100%	0,89 \pm 0,00	99,99	0,34
Sampel + zat aktif 120%	0,98 \pm 0,01	99,98	0,94



Gambar 2. Grafik kurva baku rifampisin



Gambar 3. Perbandingan kadar teoritis vs kadar trhitung sampel rifampisin

kadar 80% memiliki % *recovery* yaitu 99,91%. Larutan sampel dengan penambahan kadar 100% memiliki % *recovery* yaitu 99,99%. Dan larutan sampel dengan penambahan kadar 120% memiliki % *recovery* yaitu 99,98%.

Limit of Quantitation (LOQ)

Limit of Quantitation (LOQ) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dikuantifikasi secara andal, dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima (European Medicines Agency, 2011). Berdasarkan persamaan oleh ICH *guideline*, maka didapatkan nilai LOQ sebesar 0,0164% b/v.

KESIMPULAN

Metode analisis kapsul rifampisin dengan RP-HPLC memenuhi parameter akurasi, presisi dan linieritas.

DAFTAR PUSTAKA

- Allanson, A.L., Cotton, M.M., Tetley, J.N.A., Boyter, A.C., 2007. Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: a potential method for therapeutic drug monitoring. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 963-969.
- Asadpour-Zeynali, K., Saeb, E., 2016. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide in a Single Step. *Iran. J. Pharm. Res.* 15, 713-723.
- Benetton, S.A., Kedor-Hackmann, E.R., Santoro, M.I., Borges, V.M., 1998. Visible spectrophotometric and first-derivative UV spectrophotometric determination of rifampicin and isoniazid in pharmaceutical preparations. *Talanta* 47, 639-643.
- Brunton, L., Knollmann, B., Hilal-Dandan, R., 2017. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13th Edition, 13th Edition. ed. McGraw-Hill Education / Medical, New York.
- Calleri, E., De Lorenzi, E., Massolini, G., Caccialanza, G., Furlanetto, S., 2002. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29, 1089-1096.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014. Farmakope Indonesia, Edisi V. ed. Jakarta.
- Dolan, J., 2006. HPLC Columns John Dolan A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection [WWW Document]. URL /paper/HPLC-Columns-John-Dolan-A-Guide-to-HPLC-and-LC-MS-Dolan/078e716132ea3bc0e1663205ef160225c4e234e6 (accessed 10.13.20).
- Dolan, J., n.d. HPLC Columns A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection.
- Dong, M.W., Boyes, B.E., 2018. Modern Trends and Best Practices in Mobile-Phase Selection in Reversed-Phase Chromatography. *LC-GC Eur.* 31, 572-583.
- European Medicines Agency, 2011. Guideline on bioanalytical method validation.
- Food and Drug Administration, 2014. Methods, Method Verification and Validation - ORA-LAB.5.4.5 | FDA.
- Goutal, S., Auvity, S., Legrand, T., Hauquier, F., Cisternino, S., Chapy, H., Saba, W., Tournier, N., 2016. Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arteriovenous concentration gradient. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 123, 173-178.
- Kemenkes RI, 2017. Data dan Informasi; Profil Kesehatan Indonesia 2016. Kemenkes Jakarta.
- Khatak, S., Khatak, M., Ali, F., Rathi, A., Singh, R., Singh, G.N., Dureja, H., 2018. Development and Validation of a RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Antitubercular Drugs in Solid Lipid Nanoparticles. *Indian J. Pharm. Sci.* 80, 996-1002.

- Khuhawar, M.Y., Rind, F.M.A., 2002. Liquid Chromatographic Determination of Isoniazid, Pyrazinamide and Rifampicin From Pharmaceutical Preparations and Blood. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 766, 357-363.
- Moosavi, S.M., Ghassabian, S., 2018. Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. *Calibration Valid. Anal. Methods - Sampl. Curr. Approaches.*
- Oliveira, M.A.L., Chellini, P.R., Amorim, T.L., 2018. Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol in fixed-dose combination antituberculosis pharmaceutical formulations: A review. *Anal. Methods* 10, 1103-1116.
- Schellinger, A.P., Carr, P.W., 2014. Solubility of Buffers in Aqueous Organic Effluents for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *LCGC N. Am.* 22, 544-548.
- Shabir, G.A., Lough, W.J., Arain, S.A., Bradshaw, T.K., 2007. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30, 311-333.
- Shah, U.H., Jasani, A.H., 2014. UV Spectrophotometric and RP- HPLC Methods For Simultaneous Estimation of Isoniazid, Rifampicin and Piperine In Pharmaceutical Dosage Form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 274-280.
- United States Pharmacopeia, 2018. Rifampicin USP 41 The National Formulary 36. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville.
- Vella, J., Mifsud, M., Bartolo, N.S., Ferrito, V., Serracino-Inglott, A., Azzopardi, L.M., Laferla, G., 2014. The Combined Effects of Ph and Acetonitrile Composition on The Separation of Two Lincosamide Antibiotics. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 7, 96-100.
- World Health Organization, 2019. Global Tuberculosis Report 2019. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, 2017. Guidelines for Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis and Patient Care. World Health Organization, Geneva.