

**PENETAPAN KADAR AMLODIPIN BESILAT DAN ATORVASTATIN
KALSIUM DALAM SEDIAAN KOMBINASI TABLET DENGAN METODE
KLT VIDEO DENSITOMETRI**

Laporan Tugas Akhir

Ni Kadek Mita Pratiwi Nugraha

191FF04050



Universitas Bhakti Kencana

Fakultas Farmasi

Program Strata I Farmasi

Bandung

2021

LEMBAR PENGESAHAN

PENETAPAN KADAR AMLODIPIN BESILAT DAN ATORVASTATIN KALSIUM DALAM SEDIAAN KOMBINASI TABLET DENGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI

Laporan Tugas Akhir

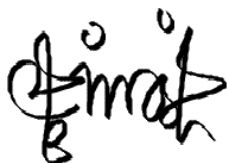
Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

Ni Kadek Mita Pratiwi Nugraha
191FF04050

Bandung, 21 Juni 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(apt. Winasih Rachmawati, M.Si)

NIDN.0412097702

Pembimbing Serta,



(Dr. Apt. Fauzan Zein Muttaqin, M.Si)

NIDN.4024117601

ABSTRAK

PENETAPAN KADAR AMLODIPIN BESILAT DAN ATORVASTATIN KALSIMUM DALAM SEDIAAN KOMBINASI TABLET DENGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI

Oleh:

NI KADEK MITA PRATIWI NUGRAHA
191FF04050

Amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium contoh obat yang tersedia diperdagangkan dalam bentuk kombinasi campuran, kedua zat aktif tersebut mempunyai efek antihipertensi. Sediaan obat dengan beberapa kombinasi zat aktif yang tidak memenuhi syarat terapi rasional dan tidak tepat sasaran, dapat membahayakan konsumen. Maka dibutuhkan analisis penetapan kadar menggunakan metode kimia sederhana, murah dan akurat salah satu contohnya yaitu KLT Video Densitometri. Tujuan penelitian ini memvalidasi metode KLT video densitometri dalam penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium pada sediaan tablet kombinasi. Penelitian meliputi uji selektivitas menggunakan fase diam plat silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak campuran toluen:metanol:triethylamin (3:7:2 tetes v/v) validasi metode analisis dan penetapan kadar pada sampel. Visualisasi dan perekaman bercak dilakukan dibawah sinar UV 254nm menggunakan alat video densitometri dan pengukuran luas dibawah kurva (AUC) dari gambar bercak menggunakan *software ImageJ*. Penotolan dilakukan manual dengan pipa kapiler. Hasil Rf pada uji selektivitas diperoleh amlodipin besilat 0,31 dan atorvastatin kalsium 0,77. Persamaan kurva kalibrasi untuk amlodipin besilat $Y = 5,3244x + 512,82$ dan untuk atorvastatin kalsium $Y = 48,406x + 10695$. Hasil penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium dalam sediaan tablet kombinasi untuk amlodipin besilat 97,99%, 96,22% dan 97,70% sedangkan untuk atorvastatin kalsium 102,69%, 102, 43% dan 101,98%. Hasil yang didapatkan memenuhi syarat parameter validasi yang sudah ditetapkan sehingga metode KLT video densitometri dapat digunakan untuk penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium

Kata kunci: amlodipin besilat, atorvastatin kalsium, KLT video densitometri

ABSTRACT

DETERMINATION OF AMLODIPIN BESILATE AND ATORVASTATIN CALCIUM LEVELS IN TABLET COMBINATION PREPARATIONS WITH VIDEO DENSITOMETRIC TLC METHOD

By:

**Ni Kadek Mita Pratiwi Nugraha
191FF04050**

Amlodipine besylate and atorvastatin calcium are examples of drugs that are commercially available in mixed combinations, both of which have antihypertensive effects. Drug preparations with several combinations of active substances that do not meet the requirements of rational therapy and are not well targeted can harm consumers. So it is necessary to analyze the test using a simple, cheap and accurate chemical method, one of which is TLC Video Densitometry. The purpose of this study was to validate the video densitometry TLC method in determining the levels of amlodipine besylate and calcium atorvastatin in the combined tablet preparation. The research included selectivity test using the stationary phase of silica gel plate GF254 and the mobile phase of a mixture of toluene:methanol:triethylamine (3:7:2 drops v/v) validation of analytical methods and sample testing. Spot visualization and recording were performed under 254nm UV light using a video densitometry tool and area under curve (AUC) measurement of the dot image using ImageJ software. Spotting is done manually with a capillary tube. The R_f results in the selectivity test obtained amlodipine besylate 0.31 and calcium atorvastatin 0.77. The equation of the calibration curve for amlodipine besylate $Y = 5.3244x + 512.82$ and for atorvastatin calcium $Y = 48.406x + 10695$. The results of the determination of amlodipine besylate and calcium atorvastatin in the combination tablet preparation of amlodipine besylate 97.99%, 96.22% and 97.70% while for atorvastatin calcium 102.69%, 102.43% and 101.98%. The results obtained meet the validation of the parameters that have been set so that the TLC video densitometry method can be used to determine the levels of amlodipine besylate and atorvastatin calcium.

Keywords: amlodipine besylate, atorvastatin calcium, TLC video densitometry

KATA PENGANTAR

Om Swastyastu,

Puji syukur bagi Tuhan Yang Maha Esa atau Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas segala limpahan karunianya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi dengan judul “Penetapan Kadar Amlodipin Besilat dan Atorvastatin Kalsium Dalam Sediaan Kombinasi Tablet dengan Metode KLT Video Densitometri”.

Skripsi ini disusun dengan tujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan kelulusan Program Strata I Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana Bandung.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih sangat jauh dari apa yang dikatakan sempurna. Untuk itu dengan segala kerendahan hati, penulis sangat mengharapkan petunjuk dan kritik dari semua, guna menyempurnakan skripsi ini dimasa mendatang.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Rektor Universitas Bhakti Kencana Bapak Dr.apr. Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes dan Ibu Dr.apr. Patonah Hasimun, M.Si selaku Dekan Farmasi Universitas Bhakti Kencana.
2. Ibu apr. Winasih Rachmawati, M. Si. selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan masukan bimbingannya, arahan, semangat serta waktunya selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Apr. Fauzan Zein Muttaqin, M.Si. selaku pembimbing serta yang juga telah memberikan masukan bimbingannya, arahan, semangat serta waktunya selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Ayah saya, I Made Wirta dan ibu saya, Komang Sri Supadmini yang selalu memberikan doa, dukungan, semangat yang tanpa henti.
5. Teman-teman farmasi angkatan 2019 yang telah membantu dan berjuang bersama selama menempuh pendidikan dikampus Universitas Bhakti Kencana Bandung
6. Dosen, Laboran, dan Staff Universitas Bhakti Kencana Bandung serta semua pihak yang telah membantu sehingga penyusunan skripsi ini dapat terlaksana dengan baik

Harapan penulis semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca. Atas perhatiannya penulis ucapkan terima kasih.

OM Shanti Shanti Shanti OM,

Bandung, 21 Juni 2021

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar Belakang Masalah	1
I.2. Rumusan Masalah	2
I.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1. Amlodipin Besilat	3
II.1.1. Sifat Fisiko Kimia	3
II.1.2. Mekanisme Efek Samping.....	3
II.1.3. Penetapan Kadar.....	4
II.2. Atorvastatin Kalsium.....	4
II.2.1. Sifat Fisiko Kimia	4
II.2.2. Mekanisme Efek Samping.....	5
II.2.3. Penetapan Kadar.....	5
II.3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	5
II.3.1. Pengertian KLT	5
II.3.2. Fase Diam.....	6
II.3.3. Fase Gerak.....	7
II.4. Densitometri	7
II.5. KLT Video Densitometri.....	8
II.6. Validasi Metode	9
BAB III. METODE PENELITIAN.....	12
III.1. Metode Penelitian.....	12
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN.....	13

IV.1. Pembuatan Larutan Baku Amlodipin Besilat 1000 bpj.....	13
IV.2. Pembuatan Larutan Baku Atorvastatin Kalsium 1000 bpj.....	13
IV.3. Pembuatan Larutan Baku Campuran.....	13
IV.4. Pembuatan Seri Larutan Baku Campuran (Penetapan Kurva Kalibrasi).....	13
IV.5. Penyiapan Sistem Optimasi KLT	13
IV.5.1. Fase Diam.....	13
IV.5.2. Optimasi Sistem KLT.....	13
IV.6. Penampak Bercak dan Optimasi Kamera	14
IV.7. Analisa Kromatogram	14
IV.8. Validasi Metode	14
IV.8.1. Uji Seletifitas.....	14
IV.8.2. Uji Sensitifitas dan Linieritas.....	14
IV.9. Perolehan Kembali	15
IV.9.1. Akurasi	15
IV.9.2. Presisi	16
IV.10. Penetapan Kadar Amlodipin Besilat dan Atorvastatin Kalsium Dalam Sediaan Tablet.....	16
IV.10.1. Persiapan Sampel.....	16
IV.10.2. Penetapan Kadar Sampel	17
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
V.1 Pencarian Optimasi Sistem KLT.....	18
V.2 Pencarian Konsentrasi Terendah.....	20
V.3 Visualisasi dan Perekaman Bercak	21
V.4 Pengukuran Bercak Secara Densitometri.....	22
V.5 Validasi Metode	23
V.5.1. Selektivitas.....	23
V.5.2. Sensitivitas (Batas Deteksi dan Batas Kuantitas)	24
V.5.3. Linieritas	25
V.5.4. Akurasi.....	26
V.5.5. Presisi.....	28
V.5.6. Penetapan Kadar Sampel	28
BAB VI. PENUTUP	30
VI.1. Kesimpulan	30

VI.2. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

Tabel IV.1. Komposisi Tablet Simulasi per Tablet.....	18
Tabel V.1. Kondisi Pemisahan Amlodipin Besilat dan Atorvastatin Kalsium Dalam Fase Gerak	21
Tabel V.2. Data Pencarian Konsentrasi Terendah	23
Tabel V.3. Hasil Uji Selektivitas	27
Tabel V.4. Hasil Data Akurasi	30
Tabel V.5. Hasil Data Perhitungan Kadar Sampel	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar. 2.1. Struktur Kimia Amlodipin Besilat.....	3
Gambar. 2.2. Struktur Kimia Atorvastatin Kalsium	4
Gambar. 5.3. Rangkaian Peralatan KLT Video densitometri	25
Gambar. 5.4. Analisis Pengukuran Densitas Bercak Menggunakan ImageJ	25
Gambar. 5.5. Ilustrasi Pemisahan Penggunaan KLT.....	26
Gambar. 5.6. Kurva Baku amlodipin Besilat	28
Gambar. 5.7. Kurva Baku Atorvastatin Klasium	28

DAFTAR LAMPIRAN

Surat Pernyataan Bebas Plagiasi	33
Surat Persetujuan Untuk Publikasi.....	34
Bukti Perizinan Tanda Tangan Virtual	35
Hasil Cek Plagiarisme Turnitin	36
Bukti Kartu Bimbingan TA1	37
Bukti Kartu Bimbingan TA2	39
Lampiran 1. Sertifikat COA Amlodipin Besilat	41
Lampiran 2. Sertifikat COA Atorvastatin Kalsium	42
Lampiran 3. Uji Selektivitas	43
Lampiran 4. Kurva Kalibrasi dan Perhitungan Linieritas.....	44
Lampiran 5. Hasil Data Akurasi	47
Lampiran 6. Hasil Data Presisi	49
Lampiran 7. Hasil Data Penetapan Kadar Sampek.....	53

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN

NAMA

KLT

Kromatografi Lapis Tipis

BAB I. PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Sediaan obat yang sering dijumpai misalkan sediaan tablet dengan beberapa macam kombinasi kandungan zat aktif. Obat yang mengandung lebih dari satu senyawa zat aktif mempunyai tujuan meningkatkan efek terapi dan memudahkan dalam pemakaian (Damayanti et al., 2010). Salah satu contoh obat yang beredar dipasaran yaitu tablet dengan kandungan amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium yang digunakan untuk pengobatan hipertensi (Kumbhar et al., 2012) Menurut Farmakope Indonesia Edisi VI tahun 2020, persyaratan kadar untuk tablet amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium yaitu kandungannya tidak kurang 90,0% dan tidak lebih 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Apabila dosis melebihi persyaratan maka dapat berpengaruh pada keamanan dari obat tersebut (Depkes RI, 2020). Banyak dijumpai sediaan obat dengan beberapa kombinasi zat aktif yang tidak memenuhi persyarat terapi rasional dan tidak tepat sasaran, hal tersebut dapat membahayakan konsumen (Asnawi et al., 2017). Maka dari itu dibutuhkan analisis penetapan kadar menggunakan metode kimia yang akurat, sederhana dan murah.

Menurut Depkes RI tahun 2020, metode yang dapat digunakan untuk pemisahan senyawa amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium adalah metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Depkes RI, 2020). Metode KCKT dapat menganalisis sediaan multi komponen dengan hasil yang baik dalam kondisi analitik yang optimum, tetapi memiliki harga yang mahal untuk peralatannya. (Damayanti et al., 2010)

Pada penelitian terdahulu telah melakukan penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium secara spektrofotometri derivatif (Kumar et al., 2013). Dan secara kromatografi cair kinerja tinggi atau HPLC deteksi fluoresensi (Moussa et al., 2013).

Penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium secara simultan dapat dikembangkan dengan menggunakan metode yang lebih sederhana seperti KLT video densitometri. Metode ini merupakan pengembangan dari KLT densitometri dimana perbedaannya adalah kromatografi lapis tipis densitometri adalah bentuk keterbaruan dari kromatografi lapis tipis yang biasa memiliki tugas hanya untuk analisis kualitatif saja. Sedangkan untuk kromatografi lapis tipis video densitometri bertugas untuk analisis kualitatif dan kuantitatif yang mengkuantitasi bercak beralaskan analisis pada gambar (Muttaqin et al., 2016).

Pemilihan metode kromatografi lapis tipis video densitometri yakni metode ini mempunyai kelebihan yaitu lebih sederhana, lebih murah, serta bisa menjadi pilihan lain untuk analisis dengan instrumen menggantikan kromatografi lapis tipis densitometri (Emawati et al., 2018)

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan dari latar belakang di atas, maka rumusan masalah dibuat sebagai berikut:

1. Bagaimana sistem kromatografi yang digunakan pada pemisahan amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium dengan metode KLT video densitometri?
2. Apakah metode kromatografi lapis tipis video densitometri pada penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium dalam sediaan tablet kombinasi memenuhi persyaratan uji validasi?
3. Berapakah kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium dalam sediaan tablet kombinasi?

I.3 Tujuan dan manfaat penelitian

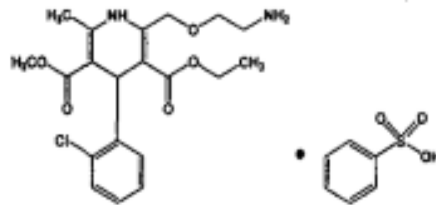
1. Menganalisis sistem kromatografi yang digunakan untuk pemisahan amlodipine besilat dan atorvastatin kalsium dengan metode KLT video densitometri
2. Mengetahui hasil uji validasi dengan metode kromatografi lapis tipis video densitometri pada penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium dalam sediaan tablet kombinasi.
3. Mengetahui hasil kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium dalam sediaan tablet kombinasi.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Amlodipin Besilat

II.1.1 Sifat Fisiko Kimia

Berdasarkan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, (2020) uraian tentang amlodipine besilat yaitu sebagai berikut:



Gambar 2.1. Struktur Kimia Amlodipin Besilat

Rumus Molekul	: $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$
Nama Kimia/IUPAC	: 3- etil 5 – metil ± - 2- [(2-aminoetoksi) metil] – 4- (o- klorofenil) – 1,4- dihidro- 6- metil-3,5- piridin dikarboksilat monobenzen sulfonat.
Berat Molekul	: 567,05
Pemerian	: Serbuk berwarna putih
Kelarutan	: Sukar larut dalam 2-propanol dan air, agak sukar larut dalam etanol dan mudah larut dalam metanol. (Depkes RI, 2020)

II.1.2 Mekanisme kerja dan Efek Samping

Amlodipin adalah obat antihipertensi golongan *Calcium Channel Blocker* (CCB) yang bekerja menghambat arus masuk ion kalsium secara selektif, melalui saluran lambat membran sel yang aktif. Golongan ini mempengaruhi dari kerja sel otot polos dan sel miokard jantung sehingga dapat mengurangi kemampuan kontraksi miokard.

Untuk efek penurunan tekanan darah amlodipin besilat bekerja secara langsung sebagai vasodilator arteri perifer yang mengakibatkan penurunan resistensi vaskular dan menyebabkan efek antihipertensi (Alegantina & Isnawati, 2015)

Efek samping dari penggunaan amlodipin besilat dapat menyebabkan edema, gangguan tidur, pusing, mual dan letih. Efek samping yang jarang terjadi pada penggunaan amlodipin yaitu gangguan pencernaan, gangguan penglihatan, tremor, ruam kulit dan tremor. Efek samping ini dipengaruhi oleh lamanya mengonsumsi obat antihipertensi. (Ariani et al., 2020)

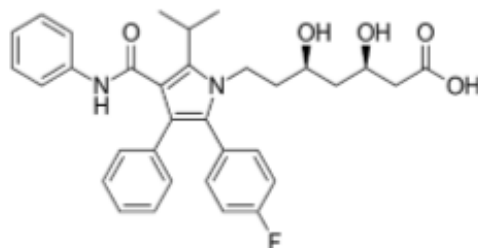
II.1.3 Penetapan kadar

Tablet amlodipin besilat mengandung amlodipin, $C_{20}H_{25}N_2O_5Cl$, tidak boleh kurang dari 90,0% dan tidak boleh lebih dari 110,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket. Penetapan kadar untuk tablet amlodipin besilat dapat dilakukan dengan metode KCKT. Campuran dapar dengan pH 3,0: metanol p: asetonitril p dengan perbandingan volume 50:35:15 sebagai fase gerak, detektor 237 nm, kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi L1. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit serta untuk volume penyuntikan $\pm 10 \mu\text{l}$ (Depkes RI, 2020)

II.2 Atorvastatin Kalsium

II.2.1 Sifat Fisikokimia

Berdasarkan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, (2020) uraian tentang atorvastatin kalsium yaitu sebagai berikut:



Gambar 2.2. Struktur Kimia Atorvastatin Kalsium.

Rumus Molekul	: $C_{33}H_{35}FN_2O_5$
Nama Kimia/IUPAC	:Asam[(3R,5R)-7-[3-(Fenilkarbamoi)-5-(4fluorofenil)-2-isopropil-4-fenil-1H-pirrol-1-il]-3,5-dihidroksiheptanoat, garam kalsium.
Berat Molekul	: 1155,36 (Anhidrat [134523-03-8] $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$) 1209,41 (Trihidrat [344423-98-9] $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10} \cdot 3H_2O$) 1231,46 (Propilen glikol solvate $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10} \cdot C_3H_8O_2$)
Pemerian	: Serbuk berwarna putih
Kelarutan	:Tidak larut hingga sangat sukar larut dalam dapar posfat pH 7,4, dalam air, dan dalam asetonitril, tidak larut dalam larutan pH 4 dan lebih kecil, sukar larut dalam etanol dan mudah larut dalam metanol.

II.2.2 Mekanisme Kerja dan Efek Samping

Atorvastatin kalsium adalah generasi kedua golongan statin digunakan sebagai terapi untuk mengurangi peningkatan kolesterol total dalam darah, bekerja dengan menghambat koenzim 3-hidroksi-3metilglutaril (HMG CoA) reduktase. HMG CoA reduktase merupakan enzim yang berperan pada sintesis kolesterol, terutama dalam hati. (Nielsen & Nordestgaard, 2014).

Efek samping dari penggunaan atorvastatin kalsium adalah miopati, hal ini terjadi bila diberikan pada dosis pada dosis tinggi, dikonsumsi bersamaan dengan fibrat, atau asam nikotinat pada dosis hipolipidemiknya. Selain itu efek samping statin lainnya dapat menyebabkan neuropati perifer, reaksi hipersensitivitas (angioderma dan anafilaksis) telah dilaporkan jarang terjadi

(Golomb & Evans, 2008)

Penetapan Kadar

Tablet Atorvastatin Kalsium mengandung atorvastatin $C_{33}H_{35}FN_2O_5$, tidak boleh kurang dari 90,0 % dan tidak boleh lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Pada penetapan kadar untuk tablet atorvastatin kalsium dapat menggunakan metode KCKT. Menggunakan campuran dapar : larutan A (campuran asetonitril P-tetrahidrofuran P (92,5:7,5)) (50:50) sebagai fase gerak, detektor 246 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi L1 serta volume penyuntikan $\pm 20 \mu\text{L}$

II.3 Kromatografi Lapis Tipis

II.3.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis adalah suatu tehnik analisis yang digunakan untuk memisahkan campuran senyawa yang tidak volatil menjadi senyawa murninya serta diketahui kuantitasnya. Kelebihan metode ini membutuhkan waktu yang singkat dan bahan yang diperlukan relatif sedikit. Suatu senyawa atau sampel dapat diketahui kemurniaanya dari timbulnya spot noda atau bercak pada plat yang akan dibandingkan dengan baku standar atau jumlah puncak kromatogram KLT. (Handayani et al., 2005). Pada tahanan awal analisis metode KLT dilakukan dengan penotolan senyawa atau sampel pada lempeng KLT atau fase diam. Terjadi mekanisme absorpsi sampel pada tahap penotolan. Penotolan sampel pada plat terdiri dari dua cara yakni manual menggunakan pipa kapiler dan otomatis

menggunakan mesin. Terdapat dua macam bentuk penotolan pada plat KLT yaitu berupa bentuk bercak ataupun bentuk pita tergantung pada tujuan analisis. Setelah penotolan pada plat selanjutnya dilakukan pengembangan dengan fase gerak yang berisi pelarut tunggal atau campuran beberapa pelarut didalam *chamber*. Pada saat pengembangan terjadi dua mekanisme yakni mekanisme desorpsi yang terjadi ketika fase gerak yang memiliki sifat lebih polar dari sampel menggantikan posisi sampel yang berada di fase diam. Setelah terlepas, solut akan terbawa oleh fase gerak yang disebut dengan mekanisme elusi hingga mencapai jarak tertentu. Jadi kedua mekanisme ini terjadi berdasarkan pada prinsip kepolaran dari senyawa tersebut. Selanjutnya plat dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan. Deteksi bercak dapat dilakukan dengan menggunakan penampak bercak atau menggunakan spektrofotometer UV-visibel. Penampak bercak terbagi menjadi dua jenis yaitu penampak bercak universal dan penampak bercak spesifik. Untuk visualisasi menggunakan spektrofotometer UV-visibel plat yang digunakan harus plat khusus yang mengandung senyawa yang dapat berfluoresensi dibawah sinar UV. Selain itu, untuk sampel yang akan dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-visibel harus mengandung kromofor agar nampak di bawah sinar UV. Hasil dari pengembangan tiap komponen digambarkan dengan nilai faktor retensi (Wulandari, 2011).

Faktor retensi dapat ditentukan dengan persamaan = $\frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh eluen}}$

Faktor retensi yang baik berkisar diantara 0,2 - 0,8 . Jika nilai faktor retensi berada di bawah 0,2 maka dilakukan penambahan kepolaran eluen sedangkan jika faktor retensi lebih dari 0,8 kepolaran eluen harus dikurangi. (Kemendikbud, 2015)

II.3.2 Fase Diam

Pada pembuatan fasa diam dalam KLT menggunakan bahan penyerap adsorbent. Hal yang harus diperhatikan untuk KLT adalah ukuran dan homogenitasnya. Ukuran partikel yang digunakan 1-25 mikron karena partikel yang halus dapat memberikan pemisahan yang baik.

Beberapa macam penyerap yang dipakai dalam KLT yaitu:

- a. Silika gel
- b. Alumina
- c. Selulosa
- d. Sephadex

- e. Kiesulguhr (Diatomaceous earth)
- f. Magnesium silikat (Kemendikbud, 2015)

II.3.3 Fase Gerak

Pemilihan fasa gerak merupakan hal yang paling penting pada sistem KLT. Pada kromatografi lapis tipis sebaiknya menggunakan eluen yang sifatnya rendah dikarenakan eluen yang bersifat tinggi menyebabkan perubahan menjadi kromatografi pembagian (Kemendikbud, 2015)

Fase gerak terdiri dari satu macam pelarut atau beberapa macam campuran pelarut. Campuran dari beberapa pelarut harus dapat tercampur dengan baik dan tidak keruh. Beberapa macam fungsi dari fase gerak atau eluen dalam KLT, antara lain:

1. Melarutkan campuran zat
2. Membawa senyawa yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga didapatkan bercak yang memiliki nilai faktor retensi memenuhi persyaratan
3. Memberikan nilai selektivitas sesuai persyaratan untuk senyawa yang akan dipisahkan (Wulandari, 2011)

Beberapa persyaratan eluen yang harus dipenuhi, antara lain:

1. Tingkat kemurnian untuk fase gerak harus sangat tinggi
2. Fase gerak harus stabil
3. Memiliki viskositas yang rendah rendah,
4. Eluen yang digunakan dapat memberikan pemisahan yang baik. Pemisahan yang baik ditandai dengan nilai faktor retensi berada di rentang 0,2 sampai 0,8.
5. Memiliki tekanan uap tidak terlalu tinggi atau rendah dan
6. Fifat toksis harus bisa serendah mungkin

II.4 Densitometri

Densitometri merupakan analisis metode instrumental berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda analit pada plat KLT berdasarkan atas absorpsi, refleksi, dan emisi. Densitometri dapat digunakan untuk uji kualitatif ataupun kuantitatif berdasarkan dari interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda analit pada fase diam KLT. Pada uji kualitatif dengan KLT densitometri yaitu membandingkan nilai faktor retensi senyawa dengan faktor retensi baku standar. Sedangkan pada uji kuantitatif menghitung densitas noda senyawa dibandingkan dengan densitas noda baku. (Wulandari, 2011).

Densitometer dilengkapi dengan spektrofotometer. Sumber radiasi yang digunakan terdiri dari tiga macam yakni sinar UV (lampu deuterium) yang digunakan untuk pengukuran

daerah ultraviolet λ 190-400 nm, sinar VIS (lampu tungsten) yang digunakan untuk mengukur daerah sinar tampak λ 400-800 nm dan zat yang berpendar sendiri (self-fluorescence) diukur fluoresensinya menggunakan lampu uap merkuri bertekanan tinggi λ 254–578 nm (Hand-Deinstrop, 2007)

Sinar yang digunakan adalah sinar polikromatik masuk melalui celah monokromator. Kemudian sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah monokromator. Sinar monokromatik dipantulkan melalui cermin dan mengenai lempeng KLT, diteruskan dan ditangkap oleh *photomultiplier* yang bertugas mengkuadratkan sinar yang masuk kemudian diperoleh elektron. (Wulandari, 2011)

II.5 KLT Video Densitometri

Kromatografi lapis tipis video densitometri adalah suatu tehnik analisis uji kualitatif dan uji kuantitatif yang berdasarkan pada analisis gambar. (Asnawi et al., 2017). Video densitometri mempunyai prinsip pemindaian optik yang berlangsung secara elektronik, menggunakan komputer dengan video digital, sumber cahaya, monokromator dan optic yang tepat untuk menerangi plat dan fokus gambar ke perangkat charge-coupled (CCD) kamera video. daya tarik utama video densitometri untuk deteksi dalam kromatografi lapis tipis adalah akuisisi data cepat dan simultan, desain instrument sederhana tanpa bagian yang bergerak, peningkatan sensitivitas, akuisisi lebih lama dan kompatibilitas dengan analisis data.

Video densitometri menggunakan sistem pencitraan yang terdiri dari:

1. Kamera CCD resolusi tinggi dengan zoom untuk fokus dan memperbesar kromatogram, jika diperlukan dan sistem pencahayaan yang sesuai
2. Kamera ini dihubungkan ke komputer (biasanya PC) dan printer video
3. Perangkat lunak untuk mengatur kamera dan semua parameter seperti kecerahan, kontras, keseimbangan warna dan intensitas
4. Kromatogram dapat disajikan dalam bentuk gambar pada printer video dan dapat diukur untuk mengetahui konsentrasi analit seperti pada pemindaian densitometri
5. Untuk analit yang lemah berfluoresen, digunakan *aperture* kamera yang kecil (F: 22) dapat digunakan dengan integrasi lama (Muttaqin et al., 2016)

Metode KLT video densitometri secara teknis berdasarkan pada analisis gambar, istilah mengacu pada penggunaan kamera digital untuk mendapatkan gambar kromatogram pada plat, lalu mengupload hasil gambar tersebut kepada komputer, dan evaluasi

kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan berbagai program perangkat lunak yang tersedia tanpa perlu membeli instrument komersial. Terdapat beberapa pilihan perangkat lunak untuk analisis gambar, diantaranya yaitu TLC Analyzer, ImageJ, Just-TLC, dan Sorbfil TLC. Software yang digunakan adalah ImageJ. ImageJ merupakan suatu program yang dikembangkan oleh *National Institutes of Health* (NIH) Departemen kesehatan dan Layanan Kemanusiaan di Amerika Serikat yang terbukti paling sederhana, mudah, dan serbaguna meskipun jenis software lainnya dapat juga dimanfaatkan. Perangkat lunak atau *software* ImageJ memakai format gambar dapat dalam bentuk JPEG atau TIFF. Sebagai contoh, gambar dari plat KLT yang melibatkan fluoresensi quenching dengan analit atau deteksi oleh warna dengan reaksi warna biasanya akan memerlukan pemilihan domain warna yang tepat dan diperlukan gambar terbalik sehingga piksel analit memiliki nilai-nilai positif terhadap piksel background, yang idealnya akan memiliki nilai kecil. ImageJ dapat mengkompensasi secara otomatis untuk setiap perbedaan luas area (Popovic Nevena, 2014)

II.6 Validasi Metode

Validasi metode merupakan suatu tindakan untuk membuktikan parameter tertentu apakah parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Harmita, 2004)

Suatu metode harus divalidasi ketika:

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi masalah analisis tertentu
- b. Metode yang sudah lama diperbaiki untuk untuk keterbaruan metode tersebut
- c. Menjamin mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring berjalannya waktu
- d. Metode baku digunakan dengan alat, laboratorium, dan oleh analisis yang berbeda
- e. Untuk untuk membandingkan 2 metode yaitu metode baru dan metode baku

validasi metode analisis terdiri dari beberapa parameter antara lain:

1. Parameter Uji Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas merupakan kemampuan untuk mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel (Gandjar dan Rohman, 2007)

Selektivitas menggunakan sampel yang mengandung bahan tambahan seperti cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, serta dibandingkan dengan hasil analisis sampel tanpa bahan tambahan. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan

cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (Harmita, 2004).

Faktor selektivitas (α) dapat ditentukan dengan:

$$\text{Faktor selektivitas } (\alpha) = \frac{drA}{drB}$$

2. Parameter Uji Sensitivitas (BD dan BK)

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Batas kuantitasi merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Penentuan batas deteksi suatu metode tergantung dari tidak atau menggunakannya instrumen. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual Sy/x (Harmita, 2004)

$$\text{Batas deteksi} = \frac{3 Sy/x}{b}$$

$$\text{Batas kuantitas} = \frac{10 Sy/x}{b}$$

3. Parameter Uji Linearitas

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Rentang metode merupakan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$.

Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur antara lain (Harmita, 2004)

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_1 - y_2)^2}{N-2}}$$

4. Akurasi (Ketepatan)

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dikatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Ketepatan dapat ditentukan dengan cara metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Pada simulasi metode, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (*plasebo*) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. % perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksepien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. Dalam kedua metode tersebut persen perolehan kembali dinyatakan dalam rasio antar hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Harmita, 2004)

$$\% \text{ Akurasi} = \frac{\text{Nilai pengukuran}}{\text{Nilai sebenarnya}} \times 100\%$$

5. Presisi (Keseksamaan)

Presisi yaitu keterulangan dari metode analisis, dinyatakan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Presisi diukur sebagai simpangan baku relatif atau koefisien variasi. Persyaratan untuk uji presisi jika memberikan nilai RSD atau KV kurang dari 2% (Harmita, 2004)

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Koefisien Variasi (KV)} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100$$

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini merupakan metode eksperimental laboratorium. Pada penelitian ini meliputi 5 tahapan yaitu optimasi sistem KLT, optimasi kamera, analisa kromatogram, validasi metode, dan penetapan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium dalam sediaan tablet campuran dengan menggunakan metode KLT video densitometri. Sampel penelitian berupa tablet kombinasi yang beredar dipasaran, yang mengandung amlodipin besilat 10 mg dan atorvastatin kalsium 10 mg. Parameter untuk uji kesesuaian sistem menggunakan metode kromatografi lapis tipis yaitu faktor retensi. Nilai Rf diusahakan sehingga diperoleh nilai Rf antara 0,2 hingga 0,8 dengan cara mengatur komposisi fase gerak. Pada visualisasi bercak pada KLT dilakukan menggunakan lampu UV 254 nm. Selanjutnya bercak pada plat KLT direkam/video menggunakan kamera digital dengan mengatur jarak fokus, shutter, dan diafragma. Gambar hasil perekaman selanjutnya dianalisis menggunakan software *ImageJ*. Setelah didapatkan uji kesesuaian sistem, selanjutnya dilakukan validasi metode analisis. Parameter validasi yang digunakan adalah selektivitas/spesifitas, linearitas, sensitifitas, dan perolehan kembali (akurasi dan presisi). Setelah semua parameter validasi memenuhi persyaratan yang sudah ditentukan maka metode ini dapat digunakan untuk menetapkan kadar amlodipin besilat dan atorvastatin kalsium yang beredar dipasaran.