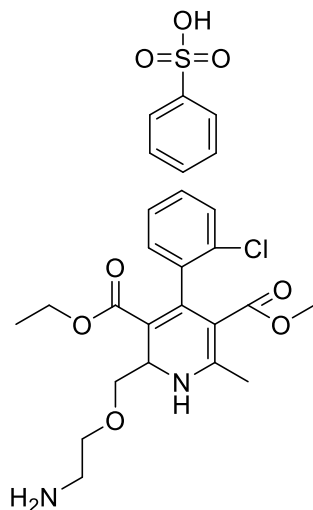


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Amlodipine Besilat

Amlodipine adalah obat hipertensi calcium channel blocker (CCB) yang secara selektif mencegah ion kalsium memasuki membran sel aktif melalui saluran lambat ini. Kelompok ini berdampak pada fungsi sel otot polos jantung dan sel miokard, yang dapat mengurangi kapasitas kontraksi miokard. Amlodipine besylate beroperasi secara langsung sebagai vasodilator arteri perifer dengan efek antihipertensi, menghasilkan pengurangan resistensi pembuluh darah dan dampak antihipertensi (Alegantina *et al.*, 2015). Amlodipine besilat memiliki efek samping termasuk edema, insomnia, mual, pusing, dan kelelahan. Amlodipine dapat menyebabkan tremor, ruam, gangguan pencernaan, gangguan penglihatan, dan efek samping yang jarang terjadi. Durasi penggunaan obat tekanan darah mempengaruhi efek negatif ini (Ariani *et al.*, 2020).

Menurut FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA, 2020 amlodipine besilat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2. 1 Struktur Kimia Amlodipin Besilat

Amlodipin Besilat mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$, dihitung terhadap zat anhidrat.

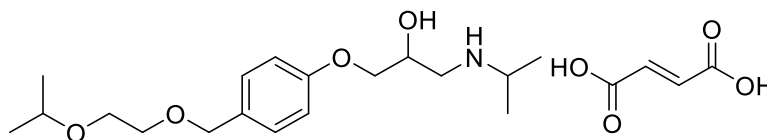
- Rumus Molekul : $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$,

- Nama Kimia/IUPAC : 3-Etil5-metil($\pm$)-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(o-klorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridindikarboksilatmonobenzen sulfonat
- Berat Molekul : 567,05
- Pemerian : Serbuk putih sampai hampir putih
- Kelarutan : Mudah larut dalam metanol; agak sukar larut dalam etanol; sukar larut dalam 2-propanol dan dalam air.

II.2 Bisoprolol Fumarate

Kelompok obat yang dikenal sebagai beta-blocker yang mengurangi tekanan darah yaitu bisoprolol fumarat. Beta blocker berfungsi dengan menghambat reseptor beta adrenergik di berbagai organ, termasuk hati, bronkus, pankreas, pembuluh darah perifer, jantung, dan pembuluh darah perifer (Khairiyah *et al.*, 2022). Waktu eliminasi bisoprolol fumarat adalah 9-12 jam, dosis awal 5 mg per hari dan dosis pemeliharaan 5-20 mg per hari (Putri & Fitriah, 2019). Bisoprolol menurunkan detak jantung dan tekanan kontraksi otot jantung, sehingga memudahkan jantung memompa darah ke seluruh tubuh, menurunkan tekanan darah dan mencegah penyakit lain seperti serangan jantung, penyakit ginjal, dan stroke (Rahmat & Emelia, 2022).

Menurut (*FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA*, 2020) Bisoprolol Fumarat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2. 2 Struktur Kimia Bisoprolol Fumarat

Bisoprolol Fumarat mengandung tidak kurang dari 97,5% dan tidak lebih dari 102,0% ($C_{18}H_{31}NO_4$) $_2$. $C_4H_4O_4$ dihitug terhadap zat anhidrat.

- Rumus Molekul : ($C_{18}H_{31}NO_4$) $_2$. $C_4H_4O_4$
- Nama Kimia/IUPAC : ($\pm$)-1-[[α -(2-isopropoksietoksi)-p-tolil]oksi]-3-(isopropilamino)-2-propanol fumarat (2:1) (garam)
- Berat Molekul : 766,96
- Pemerian : Serbuk kristal putih.

- Kelarutan : Sangat mudah larut dalam air dan dalam metanol; mudah larut dalam kloroform, dalam asam asetat glasial dan dalam alkohol; sukar larut dalam aseton dan dalam etil asetat.

II.3 Kombinasi Amlodipin Besilat dan Bisoprolol Fumarat

Menurut ESH/ESC 2013, kombinasi calcium channel blocker (CCB) + beta blocker dapat digunakan dalam kasus hipertensi untuk menurunkan tekanan darah. Amlodipine dan bisoprolol cocok dengan pedoman ini. Hal ini dikuatkan oleh penelitian (Wijayanti *et al.*, 2016), yang menunjukkan bahwa amlodipine dan bisoprolol bekerja sama lebih baik daripada amlodipine dan furosemide. Pasien yang tidak dapat menggunakan ACE Inhibitor atau Angiotensin Receptor Blockers (ARB) mungkin juga diresepkan kombinasi obat ini. Untuk melancarkan pembuluh darah dan menurunkan detak jantung, kombinasi amlodipine dan bisoprolol menghambat masuknya ion kalsium ke dalam otot polos pembuluh darah dan otot jantung (Bee *et al.*, 2022).

II.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan teknik untuk memisahkan zat kimia yang memiliki dua fase: fase gerak, yang berbentuk cairan, dan fase diam, yang berbentuk padatan (Muti'ah *et al.*, 2013). Izmailoff dan Schraiber mengembangkan kromatografi lapisan tipis (KLT) pada tahun 1938. Seiring dengan kromatografi kertas dan elektroforesis, KLT adalah jenis kromatografi planar. Dengan kromatografi lapis tipis, fase diam adalah lapisan seragam (unijorm) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh pelat kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik, sebagai lawan dari kromatografi kolom, di mana ia diisi atau dikemas di dalamnya. Namun, dapat diklaim bahwa kromatografi planar ini adalah semacam kromatografi kolom yang terbuka. (Gandjar dan Rohman, 2007).

Untuk membuat zona awal untuk analisis menggunakan KLT, beberapa sampel dimasukkan ke salah satu ujung fase diam (plat KLT). Sampel kemudian dikeringkan. Fase gerak yang dapat berupa pelarut tunggal atau kombinasi dua hingga empat pelarut murni, dicelupkan ke ujung fase diam yang berisi zona awal di dalam ruangan. Komponen campuran sampel bermigrasi melalui fase diam selama fase gerak dengan berbagai kecepatan jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar. Fase diam diambil ketika fase gerak mencapai jarak yang

diperlukan, fase gerak yang terperangkap dalam plat dikeringkan, dan zona yang dihasilkan (Wulandari, 2011).

II.2.1 Pinsip KLT

Pemisahan optimal dalam kromatografi lapis tipis hanya dapat dicapai jika ukuran titik sampel sekecil dan sesempit mungkin. Seperti metode kromatografi lainnya, Resolusi yang dikurangi dihasilkan dari penggunaan terlalu banyak sampel. Temuan menunjukkan bahwa penotolan sampel otomatis mengungguli penotolan manual, terutama ketika mengambil sampel yang lebih besar dari 15 μ l . Bercak difusi dan beberapa puncak adalah tanda-tanda penotolan sampel yang tidak tepat. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda (Gandjar & Rohman, 2007).

II.2.2 Fase diam

Pemilihan fase diam dalam KLT didasarkan pada sifat fisik dan kimia sampel yang akan dipisahkan, meliputi polaritas, kelarutan, potensial ionisasi, berat molekul, serta bentuk dan ukuran analit. . Sifat fisika dan kimia berperan penting dalam menentukan mekanisme pemisahan pada KLT. Sorben fase diam dalam KLT dapat berupa senyawa anorganik atau senyawa organik. Adsorben anorganik seperti aluminium oksida, silikon oksida, magnesium karbonat, kalsium karbonat dan lain-lain. Sedangkan adsorben organik seperti pati dan selulosa. Partikel adsorben adalah partikel halus yang dilapisi pada penyangga padat seperti kaca, plastik atau pelat aluminium. (Wulandari, 2011).

Fase diam dalam KLT adalah penjerap kecil dengan partikel yang berukuran antara 10 hingga 30 μ m. Efisiensi dan resolusi KLT ditingkatkan dengan penurunan ukuran partikel fase diam rata-rata dan peningkatan jangkauan ukuran fase diam. Bubuk silika dan selulosa adalah adsorben yang paling banyak digunakan, dan partisi dan adsorpsi adalah mekanisme adsorpsi utama dalam KLT. Lapisan tipis yang digunakan sebagai adsorben juga dapat mencakup silika termodifikasi, resin penukar ion, gel eksklusi, dan siklodekstrin yang digunakan untuk pemisahan kiral. Beberapa adsorben KLT serupa dengan yang digunakan pada KCKT. Sebagian besar adsorben dikendalikan oleh konsistensi ukuran partikel dan luas permukaan (Gandjar & Rohman, 2007).

II.2.3 Fase Gerak

Pada KLT, fase gerak dapat dipilih dari perpustakaan, namun orientasi pengembang seringkali lebih efisien dan membutuhkan lebih sedikit usaha. Karena aktivitas elusi campuran kedua pelarut organik ini dapat dengan mudah dimodifikasi untuk memaksimalkan pemisahan, ini adalah sistem yang paling sederhana. Menurut (Gandjar & Rohman, 2007) berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak:

- Fase gerak harus memiliki kemurnian yang sangat tinggi
- Daya elusi fase gerak harus disesuaikan sehingga nilai R_f antara 0,2 dan 0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- Dalam kasus pemisahan menggunakan fase diam polar, seperti silika gel, polaritas fase gerak mengontrol laju migrasi zat terlarut, dan akibatnya, nilai R_f . Pelarut seperti dietil eter dapat ditambahkan ke pelarut non-polar seperti metilbenzena untuk secara drastis meningkatkan nilai R_f .
- Larut ionik dan polar lebih baik menggunakan kombinasi pelarut sebagai fase gerak, seperti proporsi air dan metanol tertentu. Jumlah zat terlarut asam dan basa dapat ditingkatkan dengan menambahkan asam asetat atau amonia.

II.5 Densitometri

Teknik untuk penentuan analit kuantitatif dan kualitatif yang dikenal sebagai densitometri bergantung pada interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dan noda analit selama fase diam KLT. Metode KLT densitometri adalah nama lain untuk teknik ini. Kualitas KLT ditentukan dengan membandingkan nilai R_f analit dan standar, analisis densitometri dilakukan dengan membandingkan spektrum densitometri analit dan standar dari noda analit yang memiliki R_f yang sama dengan standar, kemurnian analit dipastikan. Sementara itu, luas analit dibandingkan dengan luas noda standar dalam fase diam konsentrasi yang diketahui, atau kepadatan dihitung, untuk melakukan penentuan kuantitatif analit (Wulandari, 2011).

II.6 Prinsip KLT Densitometri

Intensitas cahaya yang mengenai molekul yang saling berhubungan dalam noda dikenal sebagai radiasi elektromagnetik reaktif (REM). Jumlah cahaya yang diserap, dilepaskan, dan dipantulkan oleh noda analit dari intensitas REM awal tergantung pada bagaimana radiasi elektromagnetik berinteraksi dengan mereka selama fase diam. Cahaya yang turun dipantulkan kembali jika tidak ada noda

yang ada selama fase diam. Intensitas cahaya yang dipantulkan berbeda dengan intensitas cahaya yang berasal dari piring yang memiliki noda dari bahan kimia karena sebagian cahaya diserap (Wulandari, 2011).

II.7 KLT Video densitometri

Video densitometri Suatu teknik untuk analisis kualitatif dan kuantitatif berdasarkan analisis citra disebut kromatografi lapis tipis. Densitometri video beroperasi pada metode pemindaian optik bertenaga listrik. Dalam pemindaian ini, pelat dimasukkan ke dalam komputer yang dilengkapi dengan video digital, sumber cahaya, monokromator, dan optik yang sesuai untuk memfokuskan gambar pada perangkat yang digabungkan dengan muatan. (Muttaqin et al., 2016).

Teknik yang disebut video densitometri beroperasi berdasarkan pemindaian optik yang dilakukan secara elektronik. Pengumpulan data yang cepat dan simultan adalah daya tarik utama dari video densitometri untuk deteksi pada kromatografi lapisan tipis. Video densitometri video pada KLT memiliki beberapa manfaat, termasuk kemampuan untuk menyediakan pengumpulan data yang cepat dan simultan, desain instrumen yang lugas, sensitivitas yang lebih tinggi, periode akuisisi yang lebih lama, dan kompatibilitas dengan analisis data (Phattanawasin et al., 2009).

Menggunakan kamera digital untuk mengambil gambar kromatogram, mengunggah data ke komputer, dan melakukan analisis kualitatif dan kuantitatif menggunakan berbagai perangkat lunak tanpa perlu membeli instrumen mahal adalah bagaimana KLT video densitometri didasarkan secara teknis. Perangkat lunak untuk analisis gambar hadir dalam berbagai bentuk, termasuk TLC Analyzer, ImageJ, Just TLC, dan Sorbfil TLC. Aplikasi tersebut berjudul ImageJ. Meskipun berbagai jenis perangkat lunak dapat digunakan, ImageJ, sebuah program yang dibuat oleh National Institutes of Health (NIH) Department of Health and Human Services di Amerika Serikat, telah terbukti menjadi program yang paling mudah, ramah pengguna, dan fleksibel. Format gambar yang digunakan oleh program ImageJ dapat berupa JPEG atau TIFF. Untuk gambar dari pelat KLT yang melibatkan pendinginan fluoresensi dengan analit atau deteksi dengan warna dengan respons warna, misalnya, memilih domain warna yang tepat dan membuat gambar terbalik biasanya diperlukan. Berbeda dengan piksel latar belakang, piksel analit harus positif, idealnya dengan nilai rendah. Menggunakan

ImageJ, perbedaan area apa pun dapat disesuaikan secara otomatis (Popovic & Sherma, 2014).

II.8 Validasi metode

Salah satu langkah dalam memvalidasi metode analisis adalah mengevaluasi parameter spesifik berdasarkan tes laboratorium, dengan tujuan menunjukkan bahwa parameter tersebut memenuhi standar untuk penggunaannya. (Harmita, 2004). Untuk memastikan bahwa parameter kinerja metode analitis sesuai untuk memecahkan masalah analitis, metode ini harus diverifikasi (Gandjar & Rohman, 2007).

Parameter – parameter validasi metode analisis meliputi :

1. Parameter Uji Selektivitas (Spesifisitas)

Selektivitas atau spesifisitas mengacu pada kapasitasnya untuk secara tepat dan menyeluruh mengukur bahan kimia tunggal semata-mata dengan adanya zat tambahan yang mungkin ada dalam matriks sampel. Ketika membandingkan temuan uji sampel dengan dan tanpa aditif, seperti polutan, produk degradasi, senyawa serupa, dan bahan kimia asing lainnya, selektivitas sering ditandai dengan tingkat bias metode yang digunakan untuk menganalisis sampel. Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung kontaminan, hasil degradasi, senyawa analog, senyawa asing lain atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel yang tidak ditambahkan zat-zat tersebut. Perbedaan hasil, jika ada, merupakan perbedaan antara hasil kedua tes tersebut. Jika produk kontaminan dan degradasi tidak dapat diidentifikasi atau diperoleh, selektivitas dapat ditunjukkan dengan menganalisis sampel yang mengandung produk kontaminan atau degradasi dengan metode pengujian, berikut ini membandingkan dengan metode pengujian kemurnian lainnya seperti kromatografi, analisis kelarutan fasa, dan kalorimetri pemindaian diferensial. Kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Untuk metode analisis yang menggunakan kromatografi, selektivitas ditentukan dengan menghitung energi resolusi (R_s). (Harmita, 2004).

2. Parameter Uji Linearitas

Kapasitas metode analitik untuk memberikan respons yang secara langsung atau tidak langsung sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel

dikenal sebagai linearitas. Rentang metode adalah deklarasi batas terendah dan terbesar dari analit yang dapat ditentukan dengan linieritas, akurasi, dan presisi yang terhormat. Menurut persamaan matematika dari data yang berasal dari hasil tes analit, linearitas biasanya dinyatakan sebagai variasi di sekitar arah garis regresi. memvariasikan konsentrasi analit dalam sampel. Dengan menggunakan metode kuadrat terkecil dan pemeriksaan konsentrasi analit, digunakan garis lurus untuk menyatakan uji linearitas secara matematis. Analisis regresi linier menggunakan koefisien korelasi r sebagai parameter dimana terdapat hubungan yang linier. $Y = a + bX$. Jika $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis, diperoleh hubungan linier yang ideal. Bahkan lebih dari nilai a , sensitivitas ditunjukkan dengan analisis instrumen yang digunakan. Standar deviasi residual (S_y) adalah variabel selanjutnya yang perlu dihitung. Semua perhitungan matematis ini dapat diukur dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer. (Harmita, 2004). Linearitas dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_1 - \bar{y}_1)^2}{N - 2}}$$

3. Parameter Uji Sensitivitas (BD dan BK)

Uji sensitivitas meliputi batas deteksi dan batas kuantitasi. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam suatu sampel yang masih dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan jika dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi adalah parameter pengujian batas. Batas kuantitasi adalah parameter dalam analisis renik dan didefinisikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan menyeluruh. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik dengan menggunakan 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 (S_y/x). Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dinyatakan menggunakan rumus berikut :

$$BD = \frac{3 \frac{S_y}{x}}{slope}$$

$$BK = \frac{10 \frac{Sy}{x}}{slope}$$

4. Akurasi (Ketepatan)

Akurasi adalah ukuran seberapa dekat hasil analit dengan kadar analit sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persentase pemulihan dari analit yang ditambahkan. Keakuratan hasil analisis sangat bergantung pada distribusi kesalahan sistematis pada semua tahapan analisis. Oleh karena itu, pencapaian akurasi yang tinggi hanya dapat dicapai dengan mengurangi kesalahan sistematis, misalnya dengan menggunakan peralatan yang terkalibrasi, menggunakan reagen dan pelarut yang baik, mengontrol suhu dan melakukannya dengan hati-hati, mengikuti aturan sesuai dengan proses. Akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (jump placebo recovery) atau metode penambahan standar. Dalam simulasi, beberapa analit bahan baku murni (CRM atau chemical comparator SRM) ditambahkan ke campuran formulasi farmasi (plasebo), yang kemudian dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kandungan analit yang ditambahkan (real level). Dalam metode penambahan standar, sampel dianalisis, kemudian sejumlah analit ditambahkan ke dalam sampel, dicampur, dan dianalisis kembali. Selisih antara kedua hasil tersebut dibandingkan dengan kadar sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persentase pemulihan dinyatakan sebagai rasio dari hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Harmita, 2004). Akurasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Akurasi} = \frac{\text{Nilai Pengukuran}}{\text{Nilai Sebenarnya}} \times 100\%$$

5. Presisi (Keseksamaan)

Ketika pendekatan ini digunakan berulang kali pada sampel yang dikumpulkan dari campuran homogen, kebersamaan atau presisi ukuran tingkat kesesuaian antara temuan uji individu diukur sebagai dispersi hasil individu dari rata-rata. Simpangan baku atau deviasi standar relatif digunakan untuk menghitung presisi (koefisien variasi). Pengulangan dan reproduksibilitas adalah dua cara untuk menentukan presisi. Uji presisi harus dilakukan jika nilai RSD atau KV kurang dari 2% (Harmita, 2004).

Presisi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

- a. Standar deviasi (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_1 - \bar{X})^2}{n-1}}$$

- b. Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV)

$$KV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$