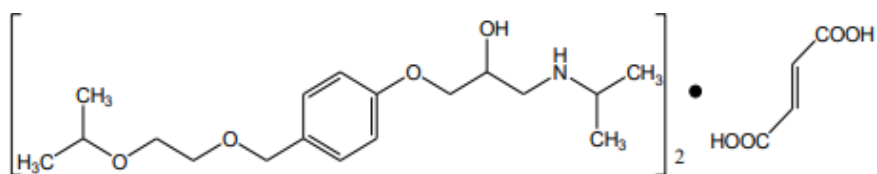


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hipertensi

Hipertensi merupakan gangguan kronis yang sering terjadi berkaitan dengan usia dan sering menyebabkan lemahnya kardiovaskular dan komplikasi ginjal. Diagnosa dari hipertensi semakin bergantung pada teknik pengukuran tekanan darah. Faktor yang menyebabkan peningkatan tekanan darah cardiac output, central nerveous sistem dan vaskular resisten dan RAAS sistem. Seseorang dinyatakan hipertensi apabila tekanan darah sistolik mencapai ≥ 140 mmHg sedangkan tekanan darah diastolik mencapai ≥ 90 mmHg, dengan pemeriksaan yang berulang. Tekanan darah sistolik merupakan tekanan darah saat jantung berkontraksi untuk memompa darah ke seluruh tubuh, sedangkan tekanan darah diastolik adalah tekanan darah yang terjadi saat jantung berelaksasi kembali memompa darah. Terdapat beberapa golongan antihipertensi yang umum digunakan yaitu Angiotensin convertimg enzyme (ACE) inhibitor, angiotensin II receptor blockers (ARBs), Calcium Channel blockers (CCB), thiazide diuretic dan beberapa kombinasi (Dipiro *et al.*, 2020).

2.2 Bisoprolol fumarate



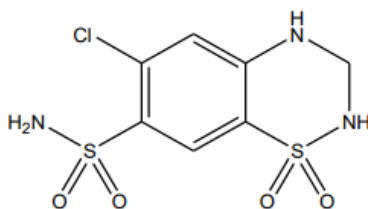
Gambar II. 1 Struktur Kimia Bisoprolol Fumarate

Nama kimia Bisoprolol fumarate yaitu -1-[[α -(2-isopropoksietoksi)-p-tolil]-3-(isopropilamino)-2-propanolfumarat, dengan rumus empiris $(C_{18}H_{31}NO_4)_2 \cdot C_4H_4O_4$ dan berat molekul 766,96 gr/mol. Tablet bisoprolol fumarate mengandung bisoprolol fumarate $(C_{18}H_{31}NO_4)_2 \cdot C_4H_4O_4$ tidak boleh kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada label. Penetapan kadar untuk tablet bisoprolol fumarate dapat dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis dengan menggunakan pelat silika gel tebal 0,25 mm dengan fase gerak yang terdiri dari diklormetana:P-metanol:P-amonia dengan perbandingan volume (70:10:0,8) dan diamati dalam sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm. Pemerian bisoprolol fumarate yaitu serbuk kristal putih. Bisoprolol fumarate sangat mudah

larut dalam air dan dalam metanol, mudah larut dalam kloroform, asam asetat glasial dan dalam alkohol ; sukar larut dalam aseton dan dalam etil asetat (Depkes RI, 2020).

Bisoprolol fumarate termasuk kedalam golongan obat antihipertensi golongan beta-blocker yang mempunyai mekanisme kerja penghambatan reseptor beta adrenergik di organ-organ seperti pada jantung, pembuluh darah perifer, hati, pankreas dan bronkus (BNF,2018) Bisoprolol fumarate bekerja selektif terhadap reseptor β_1 . Selektifitas Bisoprolol fumarate terhadap reseptor β_1 tidak mengakibatkan vasokonstriksi dan memberi keuntungan pada pasien yang memiliki riwayat gagal jantung yang mengalami penyakit paru (Gunawan dkk., 2011). Bisoprolol dapat menghambat pelepasan renin oleh ginjal, menurunkan curah jantung dan mengurangi aliran tonus simpatis dari pusat vasomotor pada otak (Aaronson dan ward, 2010). Efek samping bisoprolol sama seperti golongan beta bloker lainnya yaitu terdapat efek samping umum yang diamati setelah penggunaannya termasuk tekanan darah rendah, diare, muntah, sesak nafas, sakit kepala dan kelelahan. Beta bloker dapat ditoleransi secara baik dengan indeks terapeutik yang luas. Toleransi bisoprolol fumarate antara 5-10 mg tablet per hari (Charoo *et al.*, 2014)

2.3 Hidroklorotiazid



Gambar II. 2 Struktur kimia Hidroklorotiazid

Nama kimia Hidroklorotiazid yaitu 6-Kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dioksida dengan rumus empiris $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ dan berat molekul 297,74,Tablet Hidroklorotiazid terdiri dari hidroklorotiazida $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ tidak boleh kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Penetapan kadar untuk tablet hidroklorotiazid dapat dilakukan dengan metode kromatografi cair kerja tinggi dengan menggunakan fase gerak natrium fosfat monobasa P 0,1 M : M-asetonitril P dengan perbandingan volume (9 : 1), dengan detektor 254 nm dan kolom 4,5 mm x 25 cm berisi L1,dan laju alir lebih kurang 2 ML per menit. Pemerian hidroklorotiazid yaitu serbuk kristal putih. Hidroklorotiazid mudah larut dalam natrium hidroksida, n- butilamina dan dimetilformamida; agak sukar larut dalam metanol; sukar larut dalam air (Depkes RI, 2020)

Hidroklorotiazid mempunyai mekanisme kerja dengan menghambat re-absorpsi Na^+ di tubulus distal (Hoffman et all, 2006). Efek samping Hidroklorotiazid dapat menyebabkan hipokalemia yang masih dapat dicegah dengan suplemen kalium ataupun menggabungkan Hidroklorotiazid dengan diuretik hemat kalium, hiperurisemia dan gout (Ganiswarna, 1995).

2.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan semua metode pemisahan, berdasarkan distribusi senyawa antara dua fase yang terpisah. Dalam kromatografi lapis tipis satu fase dipasang pada pelat atau fase diam dan fase lainnya bergerak dan bermigrasi melalui fase diam (fase gerak), selama proses elusi kromatografi campuran hendak terpisahkan dan didistribusikan antara fase diam dan fase gerak (bern Spangenberg, 2011).

Pada pemisahan kromatografi lapis tipis terjadi karena adanya proses adsorpsi atau partisi. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan lembaran yang terbuat dari kaca, alumunium atau plastik yang sudah dilapisi dengan lapisan fase diam atau yang umum adalah silika gel.

Peralatan dan bahan yang dipakai cukup sederhana yaitu suatu chamber yang telah diisi pelarut dan lempeng kromatografi lapis tipis. Dengan optimasi metode dan memakai instrument komersial yang tersedia, akan mencapai pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat.

Penggunaan KLT dapat diawali dengan penotolan sampel pada ujung fase diam yang digunakan kemudian dikeringkan dapat dibantu dengan menggunakan hairdryer. Ujung fase diam kemudian dicelupan kedalam chamber yang berisi fase gerak. Campuran sampel akan berpindah dengan kecepatan yang beda-beda hal ini disebut dengan proses pengembangan kromatogram. Setelah fase gerak telah mencapai jarak yang diharapkan diambil fase diam lalu dikeringkan dan bercak yang telah diperoleh dideteksi menggunakan sinar ultraviolet. Deteksi suatu senyawa akan lebih mudah ketika senyawa dapat berwarna atau berfluoresensi. Metode KLT berlandaskan pada perbandingan nilai R_f yang dibandingkan dengan nilai R_f standar (Wulandari, 2011)

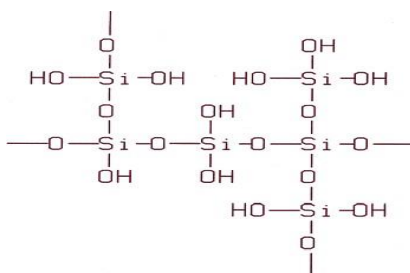
Hasil pengembangan dinyatakan dengan nilai faktor retensi (R_f). Nilai R_f adalah nilai yang menunjukkan perbandingan antara jarak perpindahan senyawa terhadap jarak yang dilewati oleh fase gerak didalam plat dengan kisaran nilai berkisar 0.2 hingga 0.8, dapat dihitung menggunakan persamaan

$$R_f = \frac{x}{x_0}$$

Dimana x merupakan jarak yang dilewati analit, dan nilai X_0 merupakan jarak yang dilewati fase gerak.

2.4.1 Fase Diam

Pengoperasian KLT dapat menggunakan plat silika gel atau alumina yang sesuai dengan lempeng gelas atau logam. Secara umum pada kromatografi lapis tipis digunakan fase diam silika gel, silika gel disebut juga sebagai asam silikat dan kieselgel yang merupakan bahan berpori amorf putih yang mengandung zat yang dapat berfluoresensi pada sinar ultraviolet. Pemisahan terjadi terutama dengan ikatan hidrogen atau interaksi dipol dengan gugus silanol permukaan dengan menggunakan fase gerak lifofilik dan analit dipisahkan menjadi kelompok-kelompok sesuai dengan polaritasnya. Beberapa parameter yang harus diperhatikan dalam pemilihan fase diam yang baik yaitu ukuran partikel, luas permukaan, volume pori-pori dan distribusi diameter (Sherma and Fried, 2003)



Gambar II. 3 Struktur Silika Gel

Struktur silika gel terikat oleh ikatan antara silikon dan oksigen yang disebut gugus siloksan. Gugus hidroksil pada permukaan berfungsi untuk mengadsorpsi sifat-sifat silika gel yang menjadi ciri pemisahan (Wall, 2005).

2.4.2 Fase Gerak

Fase gerak salah satu komponen yang diperlukan dalam suatu pemisahan, fase gerak akan berinteraksi dengan analit kemudian analit dan komponen lain yang berada dalam sampel terelusi (meninggalkan kolom menuju detektor).

Eluen merupakan fase gerak yang berperan dalam proses elusi sehingga larutan umpan untuk melewati fase diam (adsorben). Interaksi antara fase diam dan fase gerak terutama menentukan terjadinya pemisahan komponen (Fharida, 2008).

Syarat dalam pemilihan dan mengoptimasikan fase gerak :

- Fase gerak yang digunakan harus memiliki tingkat kemurnian tinggi.
- Daya elusi fase gerak diatur untuk menghasilkan R_f berkisar 0,2 – 0,8.
- Polaritas fase gerak akan menentukan nilai R_f dan kecepatan migrasi jika menggunakan fase diam yang bersifat polar.

2.4.3 Sistem Kromatografi

Sistem yang dipilih yang memberikan nilai R_f yang baik, memiliki reproduktifitas tinggi dan memiliki korelasi yang rendah dengan sistem lain.

Tabel 2. 1 Sistem kromatografi bisoprolol fumarate dan hidroklorotiazid

Sistem Kromatografi	Rf	
	Bisoprolol Fumarate	Hidroklorotiazid
TB	0,08	-
TAE	0,22	0,78
TAL	0,40	0,40
TD	-	0,04
TAJ	-	0,09
TAK	-	0,00
TAD	-	0,11

Sistem TAE

- Fase diam : Silica gel G 250 μm
- Fase gerak : metanol

(Moffat,et all, 2011)

2.5 Densitometri

Densitometri adalah suatu jenis metode analisis instrumental yang digunakan untuk menentukan analit secara kuantitatif ataupun kualitatif yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) pada bercak analit yang terdapat dalam fase diam. Interaksi radiasi elektromagnetik adalah intensitas cahaya yang menempuh molekul senyawa dalam bercak noda

yang berada pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, dipantulkan, ditransmisikan oleh noda analit.

Densitometri digunakan untuk mengukur kadar suatu senyawa yang berada pada plat KLT dengan cara pemindaian menggunakan perangkat TLC scanner, pengukuran pada metode ini dengan cara mengukur penyerapan analit (pengukuran cahaya dapat berbentuk cahaya yang diteruskan ataupun yang dipantulkan), pemadaman fluoresensi untuk lapisan yang mengandung bahan berfluoresensi analit atau hasil reaksi analit. Hasil yang didapatkan berupa visualisasi berupa kromatografi, metode ini memiliki biaya operasional dan perawatan yang sederhana.

Uji kualitatif dengan metode KLT densitometri dengan cara membandingkan nilai faktor retensi (R_f) senyawa dengan faktor retensi baku standar. Sedangkan uji kuantitatif dilakukan dengan membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar (Wulandari, 2011).

2.6 KLT Video Densitometri

Metode Kromatografi Lapis Tipis sudah dilengkapi dengan video densitometri untuk menentukan secara kuantitatif dan kualitatif dimana prinsip dari alat ini adalah ketidakhomogenan interaksi radiasi pada pelat KLT, karena adanya penyinaran lampu UV. Pengaruh dari pengaturan sistem video-imaging adalah kualitas yang dihasilkan dari pengambilan gambar. Efek yang berbeda dari pengaturan latar belakang kamera, baseline noise, sensitivitas, dan keterulangan dari pendeteksi akan mempengaruhi hasil pada pelat KLT maupun kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (KLTKT). Hal ini dikarenakan, ketepatan dan sensitivitas dari analisa kuantitatif KLT dipengaruhi oleh pengaturan dasar alat video densitometri (Petrovic *et al.*, 2000).

KLT Video densitometri adalah teknik yang dipakai untuk analisis uji kualitatif maupun uji kuantitatif yang didasarkan pada analisis gambar (Asnawi dkk, 2017). Kelebihan video densitometri dalam kromatografi lapis tipis mampu menghasilkan akuisisi data secara cepat dan simultan, mengalami peningkatan sensitivitas, kompatibilitas dengan analisis data, dan desain instrument yang sederhana. Tetapi jika muncul masalah terkait pencahayaan lapisan selama akuisisi gambar dapat ditangani dengan cara meningkatkan pencahayaan yang sesuai hingga bisa meningkatkan resolusi gambar dan kontras gambar (Srivastava, 2011).

Parameter yang digunakan dalam uji kualitatif KLT video densitometri yaitu dapat dilihat berdasarkan nilai R_f pada gambar yang dihasilkan sedangkan parameter untuk uji kuantitatif yaitu dengan melihat nilai AUC hasil dari pemindaian menggunakan perangkat lunak ImageJ.

Terdapat 4 sumber utama yang digunakan untuk penetapan kadar dengan metode KLT Video densitometri yaitu :

- a. Penotolan bercak secara kuantitatif memakai mikropipet
 - b. Penumpulan perolehan data menggunakan kamera digital
 - c. Kualifikasi dengan perangkat lunak ImageJ
 - d. Diterapkan kedalam persamaan matematika untuk mengubah data kedalam bentuk linier
- sistem pencitraan KLT Video densitometri terdiri dari :

- a) Kamera CCD resolusi tinggi dengan zoom yang digunakan untuk mengatur fokus dan memperbesar gambar kromatogram.
- b) Kamera dihubungkan dengan komputer dan printer video
- c) Perangkat lunak untuk menseting kamera dan parameter kamera seperti kontras, keseimbangan warna dan kecerahan.
- d) Hasil Kromatogram diperoleh dalam format gambar pada printer video dan dapat dihitung untuk mengetahui konsentrasi analit.
- e) Jika analit tidak berfluoresensi maka menggunakan aperture kamera yang kecil.

2.6.1 Prinsip KLT video densitometri

KLT Video densitometri berprinsip pemindaian optik secara elektronik dengan memanfaatkan komputer yang dilengkapi video digital, monokromator, sumber cahaya dan memakai optik dengan tujuan menyinari pelat dan memfokuskan gambar kedalam charge-coupled device (CCD) kamera video. Keunikan video densitometri adalah dapat mendeteksi plat KLT yang terletak pada akuisisi data yang cepat dan simultan, tampilan instrumen yang sederhana, sensitivitas tinggi, dan keandalan menganalisis data. Video densitometri tidak dapat menyaingi pemindaian densitometri dalam hal sensitivitas, resolusi, dan kegunaan berbagai pengukuran panjang gelombang (Fitriawati, 2016)

2.6.2 Perangkat Lunak untuk menganalisis bercak

Perangkat lunak yang dapat digunakan untuk analisis gambar meliputi TLC analyzer, Just-TLC, ImageJ dan sorrbfil videodensitometer (Popovic Nevena, 2014).

1. TLC analyzer

TLC analyzer merupakan perangkat lunak komputer yang dapat memindai gambar digital yang berada pada fase diatm atau plat KLT yang bisa digunakan dalam pemindaian pada gambar dan membuat grafik komponen berwarna merah, hijau dan biru (pemindaian multispektral),

selain itu alat ini dapat menghitung kerapatan optik yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Untuk mendapatkan hasil dari perangkat TLC analyzer harus memperhatikan plat KLT yang terkena sinar UV. Sinar UV memancarkan cahaya 254 nm yang dapat mendeteksi silika gel atau sampel yang berada dipermukaannya. Silika gel akan berfluoresensi warna hijau sedangkan sampel akan menyerap cahaya dan menghalangi cahaya yang akan menembus silika gel (Victoria and Hess, 2007)

2. Just-TLC

Perangkat lunak Just-TLC merupakan generasi baru yang digunakan untuk analisis KLT yang mampu menghasilkan data dari percobaan dengan menggunakan plat KLT. Perangkat ini dapat menghitung akurasi dengan tepat hanya dalam waktu beberapa menit. Perangkat ini mampu mendeteksi dan membandingkan kromatogram tiga dimensi, membandingkan hasil dari bercak atau noda yang berada lama plat KLT serta hasil yang didapat bisa diekspor melalui microsoft excel (Johnson,dkk., 2007)

3. Image J

Image J adalah salah satu perangkat lunak yang diluaskan oleh National Institutes of Health (NIH) yang telah terbukti paling sederhana dan mudah. Perangkat lunak ini menggunakan format gambar berbentuk JPEG atau TIFF (Popovic Nevena, 2014)

4. Sorrbfil Videodensitometri

Sorrbfil dapat melihat bercak yang terdapat dalam file gambar plat. Digunakan pada menu lintasan drop untuk mengontrol titik terang disuatu tempat. Garis horizontal berwarna biru dan merah, digunakan untuk menentukan area bercak, menentukan jumlah area bercak pada plat KLT dengan mengatur posisi area bercak yang berada pada plat KLT (Pattanawasin,dkk., 2012).

2.6.3 Kelebihan KLT Video Densitometri

Video densitometri mampu memvisualisasikan bentuk kromatogram dan digunakan untuk bermacam sampel dengan perawatan dan biaya operasional yang rendah (Fried,1999). Dibandingkan dengan metode KCKT, metode kromatografi lapis tipis mempunyai kelebihan diantaranya yaitu penggunaanya lebih murah dan mudah, alat yang digunakan sederhana. Metode KLT videodensitometri dapat dikembangkan secara bebas bagi kebutuhan komersial dan dapat dijadikan pilihan KLT densitometri (Emawati dkk., 2018).

2.7 Validasi Metode Analisis

Validasi metode merupakan tindakan pengukuran pada parameter yang telah ditetapkan yang didasarkan oleh pengujian di laboratorium untuk menyatakan parameter tersebut telah memenuhi syarat validasi (Harmita, 2004). Parameter yang ditetapkan yaitu selektivitas, linearitas, uji sensitifitas (batas deteksi dan batas kuantitasi), uji perolehan kembali (presisi dan akurasi).

1. Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan untuk menguji zat tertentu secara seksama dan cermat dengan atau tanpa zat lain dalam matriks sampel. Uji Selektivitas menggambarkan derajat penyimpangan metode dilakukan pada sampel yang mengandung zat pengotor atau benda asing dibandingkan dengan hasil analisis sampel tanpa bahan tambahan lain (Harmita, 2004).

Parameter selektivitas didapatkan dengan cara membandingkan nilai R_f standar dengan R_f sampel. Rumus perhitungan R_f :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh analit}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}}$$

Faktor selektivitas (α)

$$\alpha = \frac{R_{f2}}{R_{f1}}$$

2. Uji Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Penentuan linieritas ditentukan untuk mengetahui kemampuan suatu metode analisis dalam memperoleh hasil yang sesuai terhadap konsentrasi analit dalam sampel.

3. Uji Sensitifitas (Batas deteksi dan Batas kuantitasi)

Batas deteksi (BD) adalah jumlah atau konsentrasi minimum analit dalam sampel yang bisa di deteksi. Batas kuantitasi(BK) merupakan jumlah minimum analit dalam sampel dan dapat diukur dengan presisi dan akurasi. Cara menentukan batas deteksi dapat dengan metode non instrumen, dengan dilakukan pengenceran bertingkat dan dapat dihitung dengan cara mengukur respon pada blanko berkali-kali lalu dapat dihitung simpangan baku dari blanko (Arfah and Manga, 2020).

$$Q = \frac{KxSb}{Sl}$$

Q : BD atau BK

K : 3 (BD) dan 10 (BK)

Sb : simpangan baku respon analitik blanko

SI : arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b) pada persamaan garis $Y = a + bx$

Batas deteksi (BD) = $(3 S_y/x)/b$

Batas kuantitasi (BK) = $(10 S_y/x)/b$

4. Presisi

Ketelitian atau presisi adalah metode yang diperlukan untuk mengetahui respon instrument terhadap suatu analit yang bersifat tetap atau keterulangan dari waktu ke waktu. Presisi digambarkan sebagai nilai simpangan baku relatif (RSD) (Harmono, 2020). Persyaratan presisi jika menghasilkan nilai RSD atau KV 2% atau kurang (Harmita, 2004)

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

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

5. Akurasi

Akurasi atau ketepatan menunjukan derajat kedekatan antara hasil yang diperoleh dengan kadar analit yang sesungguhnya, akurasi dapat digambarkan sebagai persen nilai recovery yang mendekati 100%. Uji perolehan kembali ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya kesalahan sistematik (Harmita, 2004).

$$\% Recovery = \frac{Kadar Terukur}{Kadar Diketahui} \times 100\%$$