

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Hipertensi

Hipertensi adalah suatu keadaan ketika tekanan darah di pembuluh darah meningkat secara kronis. Hal tersebut dapat terjadi karena jantung bekerja lebih keras memompa darah untuk memenuhi kebutuhan oksigen dan nutrisi tubuh. Jika dibiarkan, penyakit ini dapat mengganggu fungsi organ-organ lain, terutama organ-organ vital seperti jantung dan ginjal. Didefinisikan sebagai hipertensi jika pernah didiagnosis menderita hipertensi/penyakit tekanan darah tinggi oleh tenaga kesehatan (dokter/perawat/bidan) atau belum pernah didiagnosis menderita hipertensi tetapi saat diwawancara sedang minum obat medis untuk tekanan darah tinggi (minum obat sendiri). Kriteria hipertensi yang digunakan pada penetapan kasus merujuk pada kriteria diagnosis JNC VII 2003, yaitu hasil pengukuran tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg atau tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg. Kriteria JNC VII 2003 hanya berlaku untuk umur ≥ 18 tahun, maka prevalensi hipertensi berdasarkan pengukuran tekanan darah dihitung hanya pada penduduk umur ≥ 18 tahun. Mengingat pengukuran tekanan darah dilakukan pada penduduk umur ≥ 15 tahun maka temuan kasus hipertensi pada umur 15-17 tahun sesuai kriteria JNC VII 2003 akan dilaporkan secara garis besar sebagai tambahan informasi (Riskesdas, 2013).

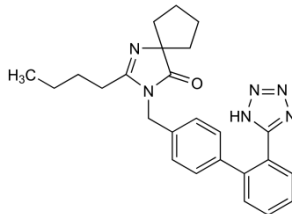
Untuk pengobatan hipertensi dikenal lima kelompok obat yang termasuk lini pertama yaitu diuretik, penyekat reseptor beta adrenergik (β -bloker), penghambat *angiotensin converting enzyme* (

ACE-inhibitor), penghambat reseptor angiotensin (*Angiotensin Receptor Bloker/ ARB*), dan antagonis kalsium. Berdasarkan penyebab hipertensi dibagi menjadi 2 golongan yaitu hipertensi primer dan hipertensi sekunder. Hidroklorotiazide dan captopril dikombinasikan untuk pengobatan hipertensi primer (Susalit, dkk., 2007).

Hidroklorotiazid termasuk golongan obat diuretik-tiazid. Hidroklorotiazid bekerja dengan menghambat transport NaCl di tubulus distal ginjal, sehingga ekskresi natrium dan klorida meningkat

II.2 Sifat fisikokimia

II.2.1 Ibersartan

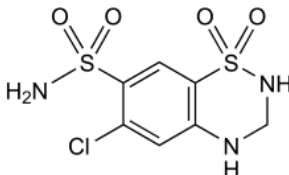


Gambar II.1 : Struktur Kimia Irbesartan (Clarke, 2005).

Irbesartan memiliki nama kimia *2-butyl-3-[p-(o-1 H-tetrazol-5-ilfenil)benzil]-1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-on*. Dengan rumus kimia $C_{25}H_{28}N_6O$ dan berat molekul 428,53 gr/mol. Irbesartan mengandung tidak kurang dari 98% dan tidak lebih dari 102% $C_{25}H_{28}N_6O$ dihitung terhadap zat anhidrat. Pemerian irbesartan

serbuk hablur putih sampai hampir putih. Kelarutan sukar larut dalam etanol dan dalam metilen klorida, praktis tidak larut dalam air.

II.2.2 Hidroklorotiazid

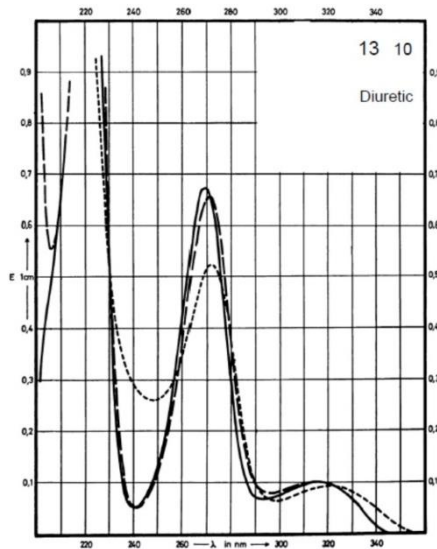


Gambar II.2 : Struktur Kimia Hidroklorotiazid (Clarke,

Hidroklorotiazid memiliki nama kimia *6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dioksida* dengan rumus molekul $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ dan berat molekul 297,74 gr/mol. Hidroklorotiazid mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

Pemerian hidroklorotiazid yaitu serbuk hablur putih, putih atau hampir putih dengan kelarutan mudah larut dalam natrium hidroksida, butilamin dan dimetilformamida; agak sukar larut dalam metanol; sukar larut dalam air; tidak larut dalam eter, kloroform dan asam mineral encer (Dirjen POM, 2014). Penyerapan spektrum inframerah hidriklorotiazid ada pada panjang gelombang 197K dengan pencampuran potasium bromid dengan pemanasan pada suhu 105° selama 2 jam (USP, 2002). Sistem kromatografi lapis tipis untuk hidroklorotiazid. Sistem TD-Rf 04; sistem TE-Rf 34; sistem TF-Rf 34;

sistem TAD-Rf 11; sistem TAE-Rf 78; sistem TAJ-Rf 09; sistem TAK-Rf 00; sistem TAL-Rf 40 (Clarke, 2005)



Gambar II.3 : Panjang Gelombang UV Hidroklorotiazid (Dibbern, dkk., 2002)

II.3 Metode analisis

Metode analisis yang dapat digunakan untuk pemisahan senyawa irbesartan dan hidroklorotiazid antara lain kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi gas, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan spektrofotometri UV (Clarke, 2005). Metode yang digunakan pada jurnal sebelumnya yaitu dengan metode HPLC dengan methanol dan asam fosfat sebagai fase gerak.

II.3.1 Kromatografi Lapis Tipis

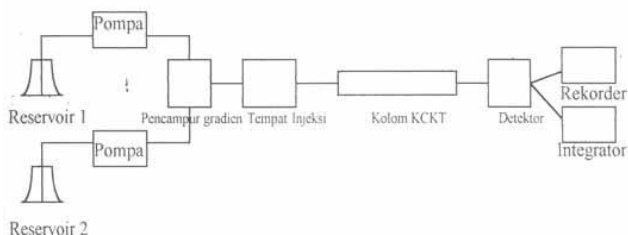
Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisika kimia, dimana lapisan pemisahannya berupa bahan berbutir-butir halus yang ditempatkan pada suatu penyangga yang berupa pelat gelas, logam atau lapisan tipis lainnya yang cocok (fase diam). Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan yang akan ditotolkan pada lapisan dengan bentuk yang tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak). Pemisahan senyawa akan terjadi selama pengembangan (Stahl, 1991)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu metode pemisahan dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif. Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesis, isolasi dari hewan percobaan, maupun dari tanaman dan mikroorganisme. KLT merupakan metode yang mudah penggunaannya, murah dan selektif, walaupun sekarang telah mengalami perkembangan (Nanang, 2009). Pengembangan KLT mengikuti perkembangan teknologi karena alat pembuat lapisan tipis, jenis fase diam, alat penotol, dan alat pelacak bercak sudah dapat dilakukan secara otomatis (Sumarno, 2001).

II.3.2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Tenaga Tinggi (KCKT) atau biasa juga disebut dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik

untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. HPLC secara mendasar merupakan sebuah perkembangan tingkat tinggi dari kromatografi kolom. Kerja HPLC pada prinsipnya adalah pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya, alatnya terdiri dari kolom (sebagai fasa diam) dan larutan tertentu sebagai fasa geraknya.



II.3.3 Kromatografi Lapis Tipis Densitometri

Densitometri merupakan metode penetapan kadar suatu senyawa pada plat KLT yang menggunakan instrumen TLC Scanner. Meskipun pada awalnya instrumen ini berdiri sendiri, namun sekarang telah terintegrasikan dengan komputer yang mengontrol instrumen ini sehingga membuat instrumen ini makin reproduktif dan akurat (Mulja M., Suharman. 1995). Keunggulannya adalah untuk analisis analit-analit dengan kadar sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Metode ini yang banyak digunakan dalam analisis kualitatif maupun kuantitatif di bidang farmasi terutama di bidang analisis obat bahan alam (Jork, dkk., 1990).

Prinsip kerja spektrodensitometri berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik dari sinar UV dengan analit yang merupakan noda pada plat. Radiasi elektromagnetik yang datang pada plat diabsorpsi

oleh analit, ditransmisi atau diteruskan jika plat yang digunakan transparan. Radiasi elektromagnetik yang diabsorpsi oleh analit atau indikator plat dapat diemisikan berupa fluoresensi dan fosforesensi. Sumber radiasi pada spektrodensitometri ada tiga macam tergantung pada rentang panjang gelombang dan prinsip penentuan. Lampu deuterium dipakai untuk pengukuran pada daerah ultraviolet (190-400 nm) dan lampu tungsten digunakan untuk pengukuran pada daerah sinar tampak (400-800 nm) sedangkan untuk penentuan secara fluoresensi digunakan lampu busur merkuri bertekanan tinggi (Deinstrop, 2007). Instrumentasi KLT Densitometri dilengkapi dengan suatu perangkat optik, sumber cahaya dan detektor seperti halnya spektrofotometer. Keuntungan utama analisis secara KLT Densitometri adalah memerlukan waktu lebih singkat dan lebih murah biaya operasionalnya dibandingkan KCKT (Jork, dkk., 1990).

Pengukuran dengan densitometer pada prinsipnya dilakukan secara pantulan (reflektans), transmisi (transmitans), atau fluoresensi.

- Cara Pantulan, yaitu pada cara ini yang diukur adalah sinar yang dipantulkan oleh bercak bahan dan bercak pembanding.
- Cara Transmisi, yaitu dilakukan dengan menyinari bercak dari satu sisi dan mengukur sinar lain yang diteruskan pada sisi lain, dalam hal ini hanya dapat digunakan pada metode sinar tampak, pengukurannya dengan cara membandingkan transmittan sinar tampak yang melewati bercak zat dan bercak pembanding. Cara ini hanya untuk bercak yang berwarna atau yang diwarnai, lapisan tipis dibuat pada lempeng kaca yang dapat tembus cahaya.

- Cara fluoresensi, yaitu pengukuran serapan fluoresensi sinar yang dipantulkan oleh bercak bahan dan bercak pembanding (khusus untuk bahan yang berfluoresensi). Hasil pengukuran dari detektor diteruskan pada alat pencatat, sehingga didapat hasil berupa puncak-puncak. Luas puncak bercak bahan dan bercak pembanding yang tercatat dibandingkan.

Langkah-langkah pengukuran kadar pada metode densitometri

- Penyiapan contoh, dilakukan dengan cara penimbangan seksama contoh, kemudian dilarutkan dengan pelarut yang sesuai sampai volume tertentu.
- Penyiapan baku pembanding, dilakukan dengan cara penimbangan baku dengan seksama, dilarutkan dalam labu takar dengan volume tertentu, kemudian diencerkan sampai variasi kadar antara 5 – 100 mikrogram.
- Pengembangan, sebelum dilakukan pengembangan terlebih dahulu larutan contoh dan baku pembanding ditotolkan pada suatu lempeng yang sama secara kuantitatif dengan menggunakan mikropipet atau *microsyringe*. Lempeng yang digunakan sebagai pendukung terbuat dari kaca, ukuran 20 × 20 cm yang dilapisi dengan silika gel GF₂₅₄ dengan ketebalan 250 mikrometer, selanjutnya lempeng dikembangkan dengan sistem pelarut yang sesuai.

- Pengukuran kadar secara langsung pada kromatogram kromatogram yang diperoleh diamati di bawah sinar ultraviolet, dan ditandai dengan menggunakan pensil 2B, setelah itu kromatogram dimasukkan pada alat densitometer untuk menentukan panjang gelombang maksimum dan serapan maksimum dari bercak contoh dan baku pembanding (Mulja M., Suharman. 1995)

II.3.4 Kromotografi Lapis Tipis Video Densitometri

Pada spektrofotometri terdapat hubungan langsung antara absorbansi dan konsentrasi dari analit dalam larutan (Hukum Beer). Absorbansi merupakan hasil dari radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang tertentu yang diserap oleh larutan sampel. Radiasi yang diserap oleh larutan yang secara langsung menunjukkan konsentrasi dari sampel (Ermer dkk, 2005). Teknik kuantitasi dapat didasarkan atas pengukuran intensitas sinar yang diserap (absorpsi), intensitas sinar yang dipantulkan (reflektansi), atau intensitas sinar yang difluoresensikan (fluoresensi). Banyaknya sinar yang direfleksikan akan ditangkap paling banyak oleh suatu alat yang disebut reflection photomultiplier yang akan diteruskan ke pencatat atau rekorder untuk diubah menjadi suatu puncak atau kromatogram.

Video densitometri merupakan metode yang mempunyai prinsip kerja pemindaian optik yang berlangsung secara elektronik menggunakan komputer dengan video digital, sumber cahaya, monokromator dan optik yang tepat untuk menerangi plat serta fokus gambar ke charge-coupled device (CCD) kamera video. Keuntungan dari metode ini dalam kromotografi lapis tipis dapat menghasilkan akuisisi data yang

cepat dan simultan, desain instrumen sederhana, terjadi peningkatan sensitivitas, akuisisi lebih lama dan kompatibilitas dengan analisis data. Kekurangan dari metode ini yaitu jika muncul adanya masalah pada pencahayaan lapisan selama akuisisi gambar, namun dapat diatasi dengan pencahayaan yang tepat sehingga dapat meningkatkan kontras gambar dan resolusi.

a. Peralatan dan software KLT Video Densitometri

Pada penetapan kadar menggunakan metode KLT Video densitometri terdapat empat sumber utama :

- Penotolan bercak secara kuantitatif menggunakan jarum suntik, *microcap* atau *micropipet*.
- Pengambilan data dengan kamera digital.
- Kualifikasi dengan software pengolah gambar imageJ.
- Diaplikasikan kedalam persamaan matematika yang sederhana untuk mengubah data mentah ke dalam bentuk linear

b. peralatan

- Plat KLT

Plat silika gel perlu ditambah gips (kalsium sulfat) untuk memperkuat pelapisannya pada pendukung. Sebagai pendukung biasanya lapisan tipis digunakan kaca dengan ukuran 20×20 cm, 10×20 cm atau 5×10 cm. Pendukung yang lain berupa lembaran aluminium atau plastik seperti ukuran diatas yang umumnya dibuat oleh pabrik. Silika gel kadang-kadang ditambah senyawa fluoresensi, agar bila disinari dengan sinar UV dapat berfluoresensi atau berpendar, sehingga dikenal dengan silika gel GF₂₅₄ nm.

- Microcaps

Untuk penotolan bercak digunakan microcap dengan volume tetap (kapasitas 0,5-5 μL), microcap dipilih karena memiliki harga yang murah dan digunakan untuk sekali pakai tetap memiliki kemampuan yang sangat baik dalam pembagian presisi. Data yang baik diperoleh ketika analit yang ditotolkan dilarutkan dalam pelarut yang kepolarannya lebih rendah dari fase gerak KLT dan ketika diperoleh spot yang melingkar. Microcap yang digunakan memiliki tingkat kesalahan $\pm 1\%$, namun kesalahan hanya berlaku jika pengisian dan pengosongan sampel pada microcap dilakukan dengan benar. Ketika mengisi microcap, microcap harus benar-benar terisi penuh. Dan ketika menotolkan sampel pada plat microcap harus benar-benar sampai kosong. Bercak sampel harus benar-benar kering sebelum plat dimasukkan ke dalam chamber.

- Kamera digital

Setelah plat dielusikan dalam chamber, kemudian plat difoto dengan menggunakan kamera digital. Foto-foto tersebut diambil dibawah sinar UV 254 nm dengan pencahayaan dari lampu UV 4 W. Tidak ada kamera khusus yang diperlakukan untuk teknik KLT densitometri. Harus diperhatikan bahwa untuk menghasilkan kuantifikasi yang baik, plat KLT pada saat difoto tidak memerlukan pencahayaan yang terlalu banyak. Penentuan jarak antara plat KLT dengan lampu UV memiliki jarak 1,5 cm. Pengaturan terbaik untuk kamera dan plat yang akan difoto ditentukan oleh kontras dan cahaya pada kamera tersebut. Fungsi pembesaran pada kamera digunakan untuk memastikan bahwa

gambar dari plat KLT sudah 80% eluen yang menarik senyawa dan mengisi sekitar 80% plat KLT.

- Data Linieritas

Setelah didapatkan beberapa data dari setiap zat aktif yang dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak dapat berupa TLC Analyzer atau ImageJ, untuk mendapatkan kadar dapat dihitung dari kurva pada zat aktif tersebut. Adanya penyerapan cahaya oleh analit pada plat KLT ini mengikuti hukum Lambert-Beer, dan atau yang didapatkan membutuhkan metode matematika untuk menghasilkan kurva standar yang diinginkan untuk suatu metode analisis. Setelah didapatkan data dari berbagai sampel kemudian dapat dimasukkan ke dalam Microsoft Excel. Namun, jika hanya beberapa penentuan yang akan dibuat, maka cukup membaca konsentrasi yang diketahui dari kurva standar.

c. Software untuk Menganalisis Bercak

Perkembangan terbaru untuk kuantifikasi kromatogram secara densitometri adalah menggunakan analisis gambar. Metode KLT video densitometri secara teknis didasarkan pada analisis gambar, istilah mengacu pada penggunaan kamera digital untuk mendapatkan gambar kromatogram pada plat, lalu mengupload hasil gambar tersebut pada komputer, evaluasi kualitatif dan kuantitatif dapat menggunakan berbagai program perangkat lunak yang tersedia tanpa perlu membeli instrumen komersial. Ada beberapa pilihan software untuk analisis gambar, diantaranya TLC Analyzer, ImageJ, Just-TLC dan Sorbfil TLC (Sherma, 2014).

1. TLC Analyzer

TLC Analyzer adalah sebuah program komputer yang menganalisis gambar digital dari plat KLT yang dapat digunakan untuk membuat scan multispektral, densitogram, dan kurva kalibrasi. Untuk mengetahui hasil analisis dari *TLC Analyzer* harus mempertimbangkan apa yang terjadi pada plat KLT yang dikenai sinar UV. Lampu UV memancarkan cahaya 254 nm yang dapat menekan silika gel di plat atau sampel pada permukaannya. Silika gel akan berpendar cahaya hijau, sedangkan sampel umumnya akan menyerap cahaya dan memblokir cahaya yang mencapai silika gel. Supaya sampel dapat menyerap sinar UV dan memblokirnya dari silika gel, sampel harus memiliki koefisien pemadaman yang tinggi (jumlah cahaya yang diserap dan tersebar) mendekati 254 nm. Beberapa sampel kimia akan berpendar pada plat silika gel, tetapi pada panjang gelombang yang berbeda. Jika konsentrasi sampel diplat relatif tinggi, bercak senyawa kimia itu akan gelap dibawah sinar UV. Dengan demikian, jika konsentrasi sampel relatif rendah, maka bercak yang akan muncul berwarna abu-abu kehijauan dibawah sinar UV (Hess, 2007).

2. ImageJ

ImageJ adalah 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. Software *ImageJ* memakai format gambar dapat dalam bentuk JPEG atau TIFF. Gambar dapat dioptimalkan dengan

pemilihan warna domain terbalik (merah, hijau atau biru). Sebagai contoh gambar dari plat KLT yang melibatkan fluoresensi *quenching* dengan analit atau deteksi oleh warna. 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 memiliki nilai yang kecil. ImageJ dapat mengkompensasi secara otomatis untuk setiap perbedaan luas area (Kurniawan, dkk., 2011).

3. JustTLC

JustTLC adalah generasi terbaru software untuk analisis KLT yang dapat memberikan hasil percobaan kimia hanya dengan menggunakan plat KLT. *JustTLC* dapat mengukur akurasi yang tepat untuk pengamatan analisis dan hasil yang dapat diandalkan hanya dalam hitungan waktu beberapa menit. Kelebihan *JustTLC* diantaranya melakukan analisis kuantitatif plat KLT dalam hitungan menit, secara otomatis dapat mendeteksi dan membandingkan kromatogram dalam tiga dimensi, membandingkan data dari bercak yang terdapat pada plat KLT dan data yang dapat diekspor ke excel atau software lainnya untuk keperluan analisis lebih lanjut, dapat mencetak grafik, hasil plat dan lembar data (Johnson, dkk., 2007).

4. Sorbfil TLC

Sorbfil merupakan software yang secara komersial tersedia dari JSC Sorb polimer. Melihat bercak yang ada dengan cara membuka file gambar plat. Kini digunakan menu lintasan drop untuk mengatur titik terang di suatu tempat. Garis horizontal berwarna merah dan biru akan

muncul, menggunakan alat tersebut untuk menuntukan area bercak yang dimaksud.