

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil penelitian terdahulu

Telah dilakukan penelitian sebelumnya tentang analisis validasi metoprolol dengan menggunakan sampel urin pada penelitian yang berjudul Penentuan Metoprolol dan Metabolitnya dalam Urin Manusia dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi secara Isokratik yang menunjukkan sensitivitas dan reliabilitas yang memadai untuk penentuan metoprolol dan α -hidroksi metoprolol secara simultan dalam sampel urin (Utami dkk.,2016).

B. Landasan teori

1. Definisi Obat

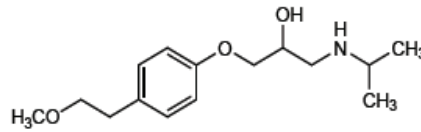
Menurut Undang-Undang Kesehatan No. 36 Tahun 2009 tentang kesehatan, obat adalah bahan atau paduan bahan, termasuk produk biologi yang digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologi dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, penyembuhan, pemulihan, peningkatan kesehatan dan kontrasepsi, untuk manusia. Obat digunakan dalam menetapkan diagnosa, mencegah, mengurangi, menghilangkan, menyembuhkan penyakit, luka badaniah dan rohaniah pada manusia atau hewan, memperelok badan atau bagian badan manusia (Anief, 2002).

Obat juga dapat didefinisikan sebagai suatu zat yang dimaksudkan untuk dipakai dalam diagnosa, mengurangi rasa sakit, mengubah atau mencegah penyakit pada manusia dan hewan. Jalur pemakaian obat yang paling efektif (secara oral, rektal, dan parenteral) harus ditentukan, demikian juga dengan petunjuk tentang dosis-dosis yang dianjurkan dalam berbagai umur, berat dan status penyakit (Ansel, 1989).

2. Definisi Metoprolol

Metoprolol adalah salah satu jenis obat penghambat reseptor beta atau *beta-blocker*. *Beta-blocker* bekerja dengan cara antara lain : (1) penurunan frekuensi denyut jantung dan kontraktilitas miokard sehingga menurunkan curah jantung; (2) hambatan sekresi renin di sel ginjal dengan akibat penurunan Angiotensin II; (3) efek sentral yang mempengaruhi aktivitas saraf simpatis, perubahan pada sensitivitas baroreseptor, perubahan neuron adrenergik perifer. Obat ini umumnya digunakan untuk menangani berbagai penyakit yang berhubungan dengan jantung dan pembuluh darah. Beberapa diantaranya meliputi hipertensi, angina, aritmia dan gagal jantung. Selain gangguan kardiovaskular, metoprolol juga dapat berfungsi untuk mengobati *thyrotoxicosis* serta mencegah migrain dan melindungi jantung dari kerusakan akibat serangan jantung. Metoprolol bekerja dengan mempengaruhi respon saraf-saraf organ tubuh, terutama jantung. Proses tersebut akan membantu memperlambat frekuensi detak jantung, mengurangi tekanan pada jantung, serta menurunkan tekanan darah. *Beta-blocker* ini akan membantu pasien dalam mengendalikan hipertensi, namun tidak akan menyembuhkan kondisi tersebut. Metoprolol juga bisa memicu efek samping yang tidak diinginkan. Beberapa efek samping yang berpotensi muncul selama mengonsumsi *beta-blocker* ini adalah pusing atau sakit kepala, detak jantung yang melambat, mata berkunang-kunang pada saat bangkit berdiri, mual, sakit perut, kaki dan tangan terasa dingin, lelah, napas tersengal-sengal dengan atau tanpa melakukan aktivitas fisik (Rampengan, 2014). Distribusi metoprolol ke jaringan baik karena metoprolol bersifat lipofil dan mudah mencapai CCS (Cairan Cerebro Spinal), sehingga lebih sering menimbulkan efek samping sentral. Ekskresi metoprolol melalui ginjal sebagai metabolit inaktif (Tan dan Rahardja,2007).

Rumus struktur metoprolol:



Gambar 2.1. Struktur Metoprolol (Martindale, 2009).

Rumus molekul : C₁₅H₁₅NO₃

BM : 684,82

Pemerian : serbuk hablur berwarna putih

Kelarutan : sangat larut dalam air, mudah larut dalam metilen klorida, dalam kloroform dan dalam etanol, sukar larut dalam aseton, tidak larut dalam eter.

pH : antara pH 6,0-7,0. (Anonim,1995).

3. Definisi Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas tergolong "kromatografi planar." KLT adalah yang metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai. Kromatografi planar juga dapat digunakan untuk pemisahan skala preparatif yaitu dengan menggunakan lempeng, peralatan, dan teknik khusus.

KLT adalah suatu metode pemisahan fisikokimia dimana fase diam terdiri dari butir-butir pada penyangga pelat gelas logam atau lapisan yang cocok (Stahl, 1985). KLT banyak digunakan di laboratorium untuk analisis maupun kontrol kualitas. Keuntungan sistem KLT adalah mudah dilakukan, tersedianya reagen yang sensitif dan selektif yang tidak dipengaruhi oleh fase gerak. Peralatan yang diperlukan sedikit, murah, sederhana, waktu analisis cepat, dan daya

pisah cukup baik (Sudjadi, 1988). KLT dapat digunakan untuk hasil kuantitatif, kualitatif atau preparatif (Gritter, dkk., 1991).

Campuran yang akan dipisahkan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, lebih baik jika digunakan pelarut yang sama dengan fase gerak atau yang kepolarannya sama dan ditotolkan berupa bercak pada lapisan. Lempeng KLT kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhi dengan fase gerak dan dielusi. Pada KLT, pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan adsorpsi atau partisi solut antara fase diam dengan fase gerak yang terjadi secara kompetitif. Senyawa yang terikat kuat pada fase diam akan terelusi paling lama dan mempunyai nilai R_f (*Retardation factor*) yang kecil, sedangkan senyawa yang tidak terikat kuat pada fase diam yang akan dielusi lebih dahulu dan mempunyai nilai R_f lebih besar. Bilangan R_f didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh garis depan fase pengembang (Stahl, 1985).

4. Cara kerja KLT

Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan aliquot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok (Wulandari, 2011).

Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Berbagai mekanisme pemisahan terlibat dalam penentuan kecepatan migrasi. Kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor, ikatan ion-ion, ikatan ion-dipol, dan ikatan van der Waals (Wulandari, 2011). Penetapan kadar suatu senyawa dengan mengukur kerapatan bercak dari senyawa yang telah dipisahkan dapat dilakukan menggunakan KLT-densitometri.

5. Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit berupa bercak pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan nota KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) pendar fluor atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. Penentuan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai R_f analit dan standar. Noda analit yang memiliki R_f sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan standar. Penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standart. Densitometri lebih dititikberatkan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Densitometri adalah alat pelacak kuantitatif yang sangat terkenal. Alat ini dilengkapi dengan spektrofotometer yang panjang gelombangnya dapat diatur dari 200-700 nm. Alat tersebut dinamakan TLC Scanner.

Teknik penggunaannya didasarkan pada pengukuran sinar yang diteruskan, diserap dan dipantulkan atau yang dipendarkan. Sinar yang dipantulkan mengalami hambatan oleh pendukung lempeng dan keseragaman fase diamnya. Sinar yang dipantulkan dengan arah yang sudah pasti menuju bercak, maka arah pantulannya sehingga dapat dipantau jumlah sinar yang diserap. Sinar ini sangat sensitif, maka untuk setiap senyawa dapat dicari dengan serapan maksimalnya. Susunan optik densitometer ini tidak banyak berbeda dengan spektrofotometer tetapi pada densitometer digunakan alat khusus yaitu reflection photomultiplier, sebagai pengganti photomultiplier pada spektrofotometer yang dapat memperbesar tenaga beda potensial listrik sehingga mampu menggerakkan integrator.

Densitometri merupakan metode penetapan kadar suatu senyawa pada lempeng kromatografi menggunakan instrumen *TLC-scanner*. Pengukuran dilakukan dengan cara mengukur serapan analit (cahaya yang diukur dapat berupa cahaya yang dipantulkan atau yang diteruskan), pemadaman fluoresensi untuk lapisan yang mengandung bahan berfluoresensi analit atau hasil reaksi analit (Gandjar dkk., 2007). Penetapan kadar dengan menggunakan kombinasi KLT dan Densitometer (KLT Densitometri) cukup ekonomis karena menggunakan fase gerak yang sedikit, waktu yang relative singkat dan dapat dilakukan penetapan kadar beberapa sampel secara simultan. Apabila dibandingkan dengan KCKT maka metode KLT tidak ada batasan fase gerak yang harus digunakan, sampel yang berupa suspensi atau keruh dapat langsung ditetapkan kadarnya, lebih cepat dan ekonomis serta memungkinkan penetapan kadar secara simultan (Yuangsoi dkk., 2008).

Komponen Densitometer

Detektor

Detektor pada alat TLC Scanner 3 CAMAG menggunakan photomultipliers. Komponen didalam photomultiplier (PMT) sendiri adalah photomultiplier tube (tabung vakum photomultiplier), photocathode (katoda metalik yang terbuat dari bahan logam multi

alkali), struktur dynode (berbentuk lempengan cekung) dan anoda (memiliki *spectral sensitivity* 185-850 nm). Prinsip kerja dari PMT adalah permukaan logam katoda disinari dengan seberkas cahaya dan sejumlah elektron terpancar dari permukaannya, yang biasa disebut dengan efek fotoelektrik dengan kondisi hampa udara. Elektron yang terpancar dan terlepas karena adanya sekumpulan energi yang timbul dan dikuatkan oleh susunan komponen dynode (linier -focused type) secara berurutan dan keluar mengenai anoda. Elektron tersebut terikat dalam logam dengan energi W (eV), yang dikenal sebagai fungsi kerja (*work function*), logam yang berbeda memiliki fungsi kerja yang berbeda pula. Logam katoda yang digunakan sebagai permukaan fotosensitif, dibawah panjang gelombang pancung (*cut off wavelength*) λ_c , sembarang sumber cahaya, selemah apapun, akan menyebabkan terjadinya pemancaran fotoelektron. Cahaya yang masuk difokuskan dengan melewati focusing electrode dan elektron mengenai dynode pertama kemudian dipantulkan dan dipancarkan ke dynode kedua sampai ke dynode yang terakhir (proses pengalihan) sehingga terjadi muatan elektron yang lebih besar dan timbul tegangan (Gandjar dkk., 2007).

Monokromator

Monokromator adalah alat yang paling umum dipakai untuk menghasilkan berkas radiasi dengan satu panjang gelombang. Monokromator untuk radiasi ultra violet, sinar tampak dan infra merah adalah serupa, yaitu mempunyai celah (slit), lensa, cermin dan prisma atau grating. Terdapat 2 macam monokromator yaitu monokromator prisma Bunsen dan monokromator grating Czerney-Turney

Fungsi prisma adalah untuk memisahkan sinar polikromatis dari sumber cahaya menjadi sinar monokromatis. Bila seberkas cahaya dilewatkan melalui sebuah prisma, maka cahaya tersebut akan diuraikan menjadi beberapa warna (terdapat berbagai warna merah, jingga, hijau, biru, dan lain-lain) (Gandjar dkk., 2007).

Absorbansi

Penyerapan hanya terjadi jika energi foton yang datang cocok dengan energy yang diperlukan untuk memindahkan satu elektron terluarnya dari tingkat dasar ke tingkat tereksitasi (atau dari pita valensi ke pita konduksi di dalam zat padat). Dengan spektroskopi dari cahaya transmisi bisa diketahui tingkat/pita energi dari suatu atom/molekul/zat padat.

Berkas radiasi elektromagnet bila dilewatkan pada sampel kimia maka sebagian akan terabsorpsi. Energi elektromagnet yang ditransfer ke molekul sampel akan menaikkan tingkat energi (tingkat tereksitasi). Molekul akan dieksitasi sesuai dengan panjang gelombang yang diserapnya (Gandjar dkk., 2007).

6. Definisi Urin

Urin adalah cairan sisa yang diekskresikan oleh ginjal yang kemudian akan dikeluarkan oleh tubuh melalui proses urinalisasi. Urin normal yaitu transparan dan jernih, sedang warna kuning muda berasal dari zat warna empedu (bilirubin dan biliverdin). Urin normal pada manusia mengandung air, urea, asam urat, amoniak, kreatinin, klorida, garam-garaman dan zat-zat lainnya (Irianto dan Waluyo, 2004).

7. Validasi Metode Analisis

Validasi metode adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Dalam prosedur validasi terdapat beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan, diantaranya:

a. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*). Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode

simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standart addition method*).

Rumus akurasi:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar sebenarnya}} \times 100\%$$

Kriteria penerimaan akurasi untuk suatu metode adalah 80 - 120 % (Harmita,2004). Nilai ketelitian yang diperoleh dapat ditentukan dengan rumus 100% - %RSD.

b. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV). Kriteria presisi dikatakan baik jika nilai simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) sebesar 2 % atau kurang (Harmita,2004). Ditemukan bahwa koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5% ada pada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16%, dan pada kadar *part per billion* (ppb) adalah 32%. Pada metode yang sangat kritis, secara umum diterima bahwa RSD harus kurang dari 2% (Harmita, 2004).

c. Selektivitas

Selektivitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan yang tidak ditambahkan. Selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s). Hasil

kromatogram obat yang akan dianalisis baik standar maupun sampel harus menunjukkan waktu retensi yang sama pada daerah sekitar waktu retensi obat tersebut tidak boleh ada gangguan yang dapat dilihat dari kromatogram larutan blanko (Harmita, 2004). Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Harmita, 2004).

d. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linear $Y = a + bx$. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Nilai a menunjukkan kepekaan analisis instrument yang digunakan (Harmita, 2004).

e. Batas Deteksi atau *Limit of Detection* (LOD) dan Batas Kuantitasi atau *Limit of Quantitation* (LOQ)

★ Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004).

$$SY/X = \sqrt{\frac{\sum(\bar{Y} - Y_i)^2}{n-2}}$$

$$LOD = \frac{3 \times SY / X}{slope}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SY / X}{slope}$$

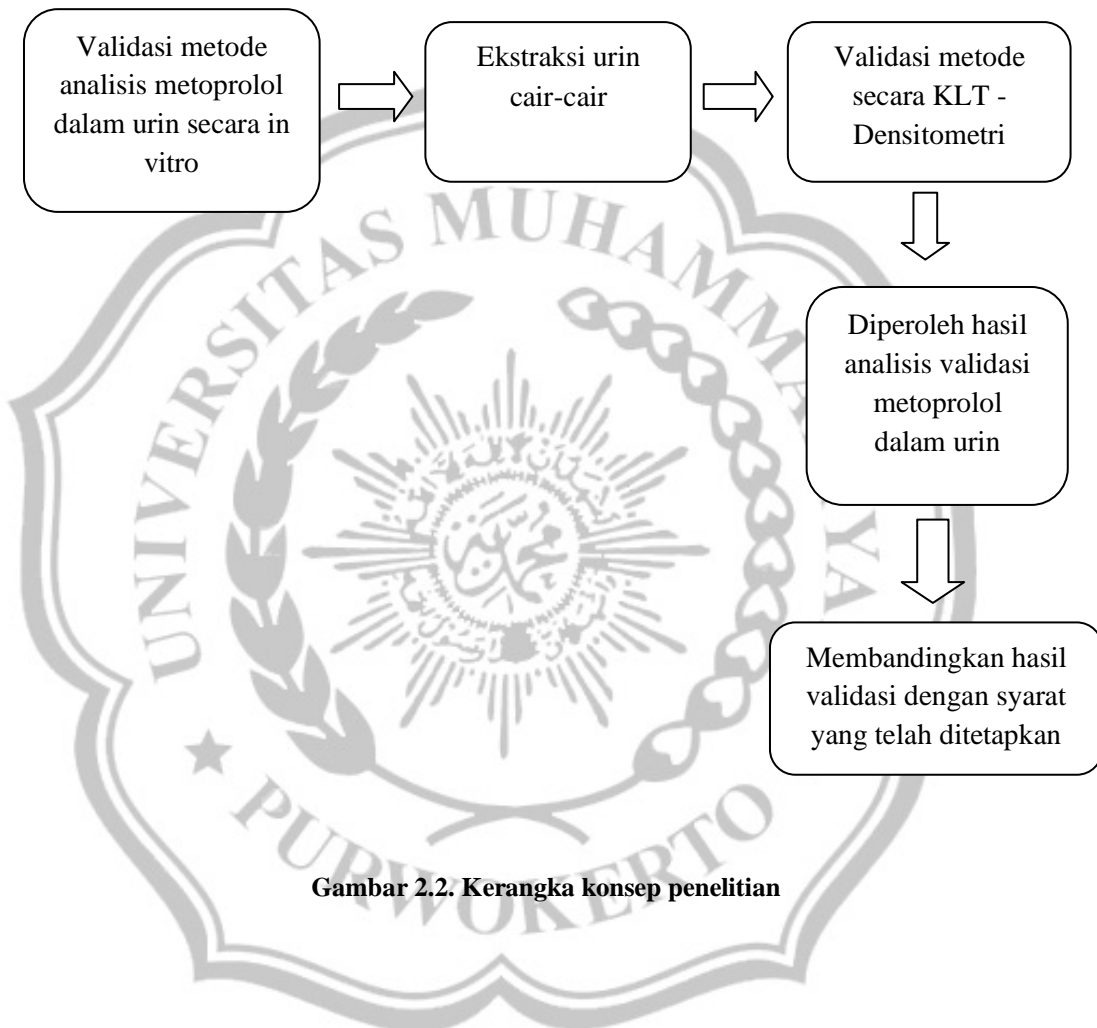
Keterangan :

LOD = *Limit of Detection* ($\mu\text{g/ml}$)

LOD = *Limit of Quantitation* ($\mu\text{g/ml}$)

SY/X = Simpangan Baku Residual (Harmita,2004).

8. Kerangka konsep



Gambar 2.2. Kerangka konsep penelitian