

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

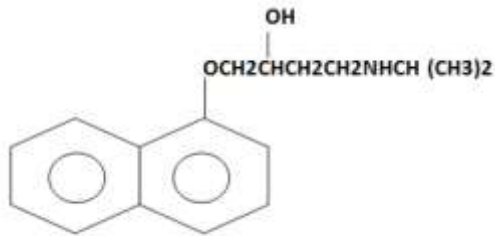
Bhavar (2008), melaporkan metode *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC) telah dikembangkan untuk determinasi propranolol hidroklorid dari formulasi obat dan sediaan tablet. Penelitian ini menyatakan metode HPTLC sudah memenuhi parameter validasi dan syarat pedoman dari *International Conference on Harmonization* (ICH) dan metode ini dapat digunakan secara berturut-turut untuk penentuan obat dalam tablet dengan hasil yang diperoleh nilai LOD sebanyak 0,056 µg, LOQ sebanyak 0,108 µg. Penelitian yang dilakukan oleh Satish (2011), menunjukkan metode HPTLC dapat digunakan untuk mendeterminasikan propranolol dan diazepam dalam tablet dengan nilai LOD dan LOQ propranolol sebanyak 0,0056 µg dan 0,018 µg, *recovery* sebanyak 100,3 % .

Mennicken, *et al* (2012) dalam penelitiannya menyatakan pengembangan metode HPTLC dalam serum merupakan metode yang akurat dibuktikan dengan nilai LOD dan LOQ sebanyak 0,0597 µg dan 0,180 µg, nilai *recovery* antara 96,35-98,82% dan nilai RSD tidak lebih dari 4% yang selektif dengan zat yang diuji.

Baker, *et al* (1973) melakukan penelitian dalam plasma manusia untuk menentukan adanya propranolol dalam plasma menggunakan metode gas chromatographic (GC) dengan hasil yang diperoleh yaitu, *Recovery* sebanyak 77,8 % dengan jumlah obat pada linearitas berada pada rentang 0,005 - 0,008 µg. Penelitian lain yang dilakukan oleh Quaglio, *et al* (1993) menggunakan metode *gas chromatography with mass spectrometry* (GC-MS) diperoleh hasil RSD sebanyak 9,0309%, *recovery* 91,0813%, dengan rentang konsentrasi yang digunakan 0,05 µg.

B. Landasan Teori

1. Propranolol



**Gambar 2.1 struktur propranolol hidroklorida
Depkes RI, 1995**

Propranolol hidroklorida merupakan serbuk hablur, putih atau hampir putih, tidak berbau, dan rasa pahit. Kelarutannya larut dalam air dan etanol, sukar larut dalam kloroform, dan praktis tidak larut dalam eter (Depkes RI, 1995).

Propranolol merupakan suatu obat golongan β - *bloker* yang efektif terhadap penyakit hipertensi. Propranolol sebagai penghambat *adreno reseptor* beta yang sangat berguna untuk menurunkan tekanan darah pada hipertensi ringan dan hipertensi sedang. Pada hipertensi berat, propranolol berguna dalam mencegah terjadinya reflek takikardia yang sering timbul pada pengobatan dengan *vasodilator* beta bloker (Katzung, 2007). Propranolol HCl mengalami metabolisme lintas pertama di hati oleh sitokrom P450 (CYP) 2C19 dan CYP2D6 sehingga bioavailabilitasnya rendah antara 15-23 % pada pemakaian oral. Ekskresi propranolol sebagian di urine (< 4 %) dan sebagian lagi diekskresikan dalam bentuk utuh obat tersebut (Namdeo & Jain, 2002). Propranolol hampir diserap sepenuhnya oleh tubuh setelah pemberian oral, mengalami *first pass metabolism* yang cukup besar dan memiliki kelarutan yang tinggi di dalam lipid serta cepat didistribusikan ke seluruh tubuh dengan jumlah tertinggi ditemukan pada paru-paru, hati, ginjal, otak dan jantung. Propranolol 90 % beredar terikat pada protein plasma dengan waktu paruh ($T_{1/2}$) 3-6 jam. Konsentrasi terapeutik propranolol dalam plasma berkisar antara 0,05- 1mg/L setelah pemberian oral (Moffat, 2011 : 1974-1976). Efek toksik yang dihasilkan oleh propranolol erat kaitannya dengan kadar propranolol dalam plasma. Kristinsson (1977), menyatakan bahwa Propranol

menghasilkan efek toksik dengan kadar > 2 mg/L dalam plasma dan efek letal dengan konsentrasi >4mg/L dalam plasma.

2. Plasma

Plasma darah merupakan bagian cair darah. Cairan ini diperoleh dengan membuat darah tidak beku setelah dilakukan sentrifugasi. Sekitar 90% plasma terdiri dari air, 7-8% protein dan dalam plasma juga terkandung garam-garam, karbohidrat, lipid dan asam amino. Plasma berbeda dengan serum, serum adalah plasma yang fibrinogennya telah dihilangkan dengan proses penjendalan, sedangkan plasma diperoleh dengan menambahkan suatu pencegah penjendalan di dalam darah. Bila darah tidak diberi antikoagulan maka terjadilah penggumpalanan bila disentrifuge maka cairan beningnya adalah serum (Munson, 1991 :4).

Pengukuran obat dalam plasma merupakan panduan yang dapat digunakan untuk penyesuaian dosis ketika suatu obat tidak dapat menghasilkan respon atau untuk mengantisipasi efek toksik yang akan ditimbulkan oleh suatu obat. Pengukuran kadar obat dalam plasma dapat memberikan informasi mengenai jumlah obat yang tertahan di dalam atau ditranspor ke dalam jaringan atau cairan, efek farmakologis atau toksikologis dari pendosisan obat, dan pembentukan atau transport metabolit obat (Shargel & Andrew, 2012 : 5-9) Pengikatan obat didalam darah dapat dihitung untuk mengetahui konsentrasi obat bebas yang berada dalam kesetimbangan dengan jaringan tubuh (Sukmawati, 2006 :1).

3. Kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satunya bergerak berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalam zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas yang disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan ion, sehingga masing-masing zat dapat diidentifikasi dengan metode analitik (Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan RI, 1995). Teknik kromatografi biasanya

mempunyai zat terlarut yang terdistribusi antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 µm. Semakin kecil ukuran partikel dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusinya.

Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang melebar dan puncak ganda. Penjerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa, sedangkan mekanisme yang utama dalam KLT adalah partisi dan adsorpsi. Fase gerak merupakan pelarut pengembang yang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara mekanik (*ascending*) atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Gandjar dan Rohman, 2007).

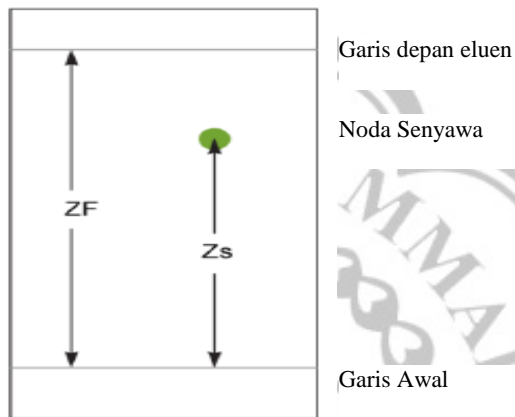
Kromatografi dapat dibedakan dalam beberapa macam tergantung dari pengelompokannya. Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya kromatografi dibedakan menjadi : kromatografi adsorpsi ; kromatografi partisi; kromatografi pasangan ion ; kromatografi penukar ion; kromatografi eksklusi ukuran dan kromatografi afinitas. Berdasarkan pada penggunaan alat yang digunakan dapat dibedakan menjadi : kromatografi kertas; kromatografi lapis tipis (KLT); kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan kromatografi gas (Gandjar dan Rohman, 2007).

Parameter dari kromatografi lapis tipis adalah faktor retensi (Rf) merupakan perbandingan jarak yang ditempuh solut dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Adapun rumusnya adalah sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

Nilai Rf biasanya lebih kecil dari 1, sedangkan jika dikalikan dengan 100 akan bernilai 1-100, sehingga parameter ini dapat digunakan untuk perhitungan

kualitatif dalam pengujian sampel pada kromatografi lapis tipis (Sumarno,2001).Pada Rf kurang 0,2 belum terjadi kesetimbangan antara komponen senyawa dengan fase diam dan fase gerak sehingga bentuk noda biasanya kurang simetris. Pada bilangan Rf diatas 0,8 noda analit akan diganggu oleh absorbansi pengotor lempeng fase diam yang teramati pada visualisasi dengan lampu UV (Wulandari,2011).

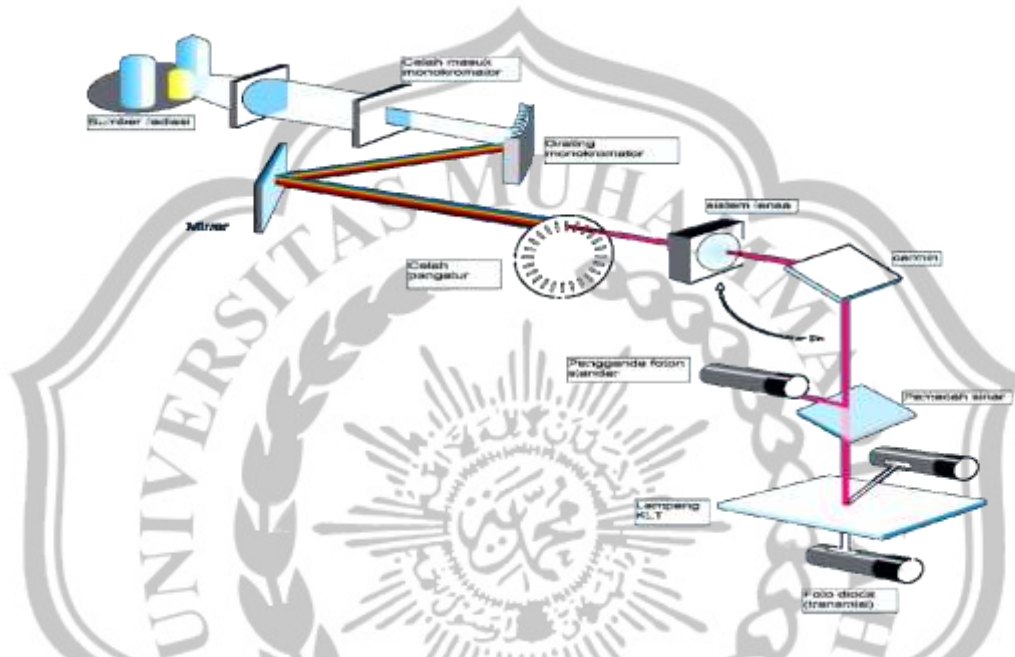


Gambar 2.2 ilustrasi migrasi analit dan eluen pada lempeng KLT

4. Densitometri

Densitometri merupakan metode analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT Densitometri. Penentuan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai Rf analit dan baku. Noda analit yang memiliki Rf sama dengan baku yang diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan baku. Penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda baku pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda baku. Interaksi radiasi elektromagnetik (REM) merupakan intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan

(refleksi) oleh noda analit dari intensitas REM semula. Apabila pada fase diam tidak ada noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Tetapi jika cahaya tersebut dijatuhkan pada pelat yang terdapat noda dari suatu senyawa, maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas cahaya yang datang (Wulandari, 2011).



Gambar 2.3 skema sistem optik densitometer camag (Wulandari, 2011)

Metode KLT densitometri ini memiliki beberapa kelebihan yang memiliki spesifitas yang tinggi, dapat dipercaya, pengerjaannya relatif mudah dan cepat, biaya pengoprasian relatif murah, polaritas pelarut dan pelarut campuran dapat diubah dalam waktu yang singkat dan dalam jumlah pelarut yang digunakan sedikit (Wulandari,2013). Jika dibandingkan dengan metode KCKT, metode KLT memiliki kelebihan yaitu pelaksanaan yang lebih mudah dan lebih murah, serta peralatan yang digunakan lebih sederhana. Selain itu, metode KLT memberikan fleksibilitas yang besar dalam hal fase gerak, mempunyai berbagai teknik dalam berbagai pemisahan, proses kromatografi dapat diikuti dengan mudah dan semua komponen dalam sampel dapat dideteksi karena metode ini memungkinkan terjadinya pemisahan sampel secara serentak (Wulandari,2013).

5. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu proses penilaian terhadap metode analisis tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa metode tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan (Harmita,2004).

Adapun beberapa parameter dalam validasi yaitu:

a. Selektivitas

Selektivitas digunakan untuk mengetahui apakah metode yang digunakan dapat digunakan untuk memisahkan dan membedakan senyawa yang satu dengan senyawa yang lain ketika dalam suatu campuran. Harga $R_s > 1,5$ disebut dengan *baseline resolution* yaitu pemisahan sempurna dari dua puncak dengan ukuran yang sama. Dalam Prakteknya pemisahan dengan harga $R_s = 1,0$ (kedua puncak berhimpit $< 2\%$) dianggap memadai untuk tujuan analisis (Pescok *et al*, 1976).Nilai resolusi (R_s) dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Resolusi } (R_s) = \frac{2(RfA - RfB)}{WA + WB} \quad (1) \text{ (Watson,1999)}$$

Keterangan :

Rf Adan Rf B = nilai dari *peak* A dan B

WA dan WB = lebar *peak* A dan B

b. Linearitas

Linearitas menunjukkan suatu kemampuan metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam kisaran konsentrasi tertentu. Hal ini dapat dilakukan dengan membuat kurva baku dari beberapa larutan baku yang telah diketahui konsentrasinya. Persamaan garis yang digunakan pada kurva baku diperoleh dari metode kuadrat kecil yaitu $y = bx + a$, sehingga dari persamaan ini akan deperoleh nilai koefisien korelasi (Harmita,2004).Kisaran konsentrasi yang digunakan dalam linearitas harus cukup luas untuk memenuhi kisaran metode yang diharapkan. Minimal 5 kisaran konsentrasi harus diamati dan

suatu plot antara respon detektor dengan konsentrasi sampel harus dihasilkan (Rohman, 2009).

c. *Limit Of Detection (LOD)* dan *Limit Of Quantitation (LOQ)*

LOD digunakan untuk mengetahui jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. LOQ digunakan untuk mengetahui jumlah analit pada sampel yang masih dapat memberikan kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004).

d. Akurasi

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar yang sebenarnya. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*baku addition method*) (Harmita, 2004).

e. Presisi

Uji presisi merupakan uji yang digunakan untuk membuktikan ketelitian suatu alat berdasarkan akurasi individu hasil analisis yang ditunjukkan dengan nilai Baku Deviasi (SD) dan *relatif baku deviation (RSD)*. Nilai RSD antara 1-2% untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah banyak, sedangkan untuk senyawa dengan kadar sekelumit, RSD berkisar antara 5-15% (Gandjar Dan Rohman, 2007).

C. Kerangka Konsep

