

# Optimization and Validation of Clobazam Content Determination Method in Tablet Preparations Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Rosita Agustina<sup>1\*</sup>, Dikdik Mulyadi<sup>1</sup>, Lela Mukmilah Yuningsih<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Universitas Muhammadiyah Sukabumi, Sukabumi, Indonesia;

## Article History

Received : July 20<sup>th</sup>, 2025

Revised : July 25<sup>th</sup>, 2025

Accepted : July 29<sup>th</sup>, 2025

\*Corresponding Author:

**Rosita Agustina**, Program  
Studi Kimia, Saintek,  
Universitas Muhammadiyah  
Sukabumi, Jawa Barat,  
Indonesia-

Email:

[Rositaagustina@ummi.ac.id](mailto:Rositaagustina@ummi.ac.id)

**Abstract:** Clobazam is a tablet-shaped drug whose concentration was analyzed using the HPLC separation method. Analysis of clobazam concentration using a method in accordance with FI VI, with a mobile phase composition of 70 mL of water and 30 mL of acetonitrile, resulting in a retention time of 21 minutes. The purpose of this study was to obtain the most optimal composition of the mobile phase and column to obtain a faster retention time in the analysis of clobazam levels. As well as to validate the analysis method whose results are in accordance with the validation requirements in the Indonesian pharmacopoeia VI. Data were analyzed using linearity tests, specificity or selectivity tests, accuracy tests, repeatability and intermediate precision tests, robustness tests, and LOS and LOQ tests. The results showed a theoretical plate number of 1711.5, a tailing factor of 1.34, and a retention time of 1.69 minutes using a C18 column measuring 150 x 3 mm 3  $\mu$ m with a mobile phase ratio of acetonitrile: water of 80:20. The validation results of the analytical method for accuracy, precision, selectivity, and robustness showed RSD <2%, Detection Limit (LOD) 0.0014 mg/mL, Quantification Limit (LOQ) 0.0042 mg/mL, and the linearity test results showed a correlation coefficient of 0.999, meeting the FI VI validation criteria. The conclusion is that differences in the composition of the mobile phase and the particle size of the column greatly affect the characteristics of the chromatogram produced in HPLC analysis.

**Keyword :** HPLC, Purity clobazam, Validation of analysis.

## Pendahuluan

Clobazam merupakan derivat benzodiazepin yang telah lama beredar sebagai anxiolitik, yang memiliki potensi sebagai antikonvulsan. Benzodiazepin yang bekerja sebagai *Gamma Amino Butyric Acid* (GABA) menghambat transmisi neuron. GABA juga dapat berperan sebagai anti ansietas sehingga dapat menurunkan kecemasan pada pasien epilepsi, dimana obat anti epilepsi yang direkomendasikan oleh Perdossi 2014 untuk terapi kejang epilepsi umum maupun fokal (Nurdianto *et al.*, 2021). Kadar Klobazam dalam sediaan tablet dapat diketahui dengan metode analisa pemisahan menggunakan KCKT.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah proses pemisahan senyawa berdasarkan kepolarannya (Aulia & Muchtaridi, 2016; Fertiasari & Kristiandi, 2023). KCKT terdiri dari kolom yang digunakan sebagai fase

diam dan larutan tertentu sebagai fase gerak, detektor yang lebih sensitif dan peka serta suatu kemajuan teknologi pada pompa yang memiliki tekanan tinggi yang menyebabkan KCKT menjadi salah satu metode dengan sistem pemisahan zat yang cepat, selektif dan juga efisien (Johnson & Stevenson, 1991).

Metode analisa yang efisien dapat diperoleh dengan melakukan optimasi metode analisa yang merupakan proses perbaikan prosedur untuk mencapai hasil yang baik dan efisien. Setelah didapatkan hasil yang terbaik selanjutnya dilakukan validasi metode analisis yaitu proses yang dilakukan berdasarkan percobaan laboratorium dimana menguji karakteristik dari suatu prosedur dengan memenuhi persyaratan standar selektivitas, akurasi, dan presisi sesuai tujuan yang diharapkan dalam penggunaannya. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan komposisi fase gerak dan kolom yang paling optimal untuk

mendapatkan waktu retensi yang lebih cepat dalam analisa kadar klobazam. Serta melakukan validasi metode analisa yang hasilnya sesuai dengan syarat validasi pada farmakope Indonesia VI.

## Bahan dan Metode

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian berlangsung pada bulan Oktober – Desember 2024 bertempat di Laboratorium Kimia salah satu perusahaan farmasi di Sukabumi. Sampel yang digunakan adalah tablet clobazam dari salah satu perusahaan farmasi di Sukabumi.

### Alat dan bahan

Alat penelitian terdiri dari timbangan neraca analitik (*Shimadzu AP225WD*), labu ukur 100 mL (*Pyrex*), labu ukur 20 mL (*pyrex*), gelas kimia 1000 mL, batang pengaduk, KCKT (*waters Alliance e2695*), *millex syringe filter* 0.45  $\mu$ m, kolom C18 150 x 3 mm 3  $\mu$ m dan kolom C18 125 x 4.0 mm 5  $\mu$ m, Elma Ultrasonic, *syringe* 25 mL, botol fase gerak, pH meter, vial KCKT 1.5 mL, pipet mohr 5 mL dan pipet volumetrik 2.0 mL. Bahan yang diperlukan di antaranya standar clobazam BPFI, tablet clobazam buatan, air murni, asetonitril (merck), laktosa monohidrat 120, *Cornstarch*, *Microcell 102*, *Povidone K30*, *Sodium Strach Glycolate* (SSG), *Talk Powder*, *Magnesium Stearate*, *Aerosil*.

### Prosedur

#### Kondisi Pengerjaan KCKT

Menggunakan kolom C18 150 x 3 mm 3 $\mu$ m, Kolom C18 125 x 4 mm 5  $\mu$ m dengan fase gerak Asetonitril: air murni (10:90), Asetonitril: air murni (20:80), Asetonitril: air murni (30:70), Asetonitril: air murni (40:60), Asetonitril: air murni (50:50), Asetonitril: air murni (60:40), Asetonitril: air murni (70:30), Asetonitril: air murni (80:20), Asetonitril: air murni (90:10). Aliran pompa 1 mL / menit, panjang gelombang detektor 230 nm menggunakan detektor UV-VIS, volume injek 25  $\mu$ L dengan suhu kolom 40°C, pelarut asetonitril: air murni (50:50).

#### Larutan standar induk

Timbang seksama 40.0 mg clobazam WS, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, menambahkan 25 mL pelarut, sonikasikan selama  $\pm$  10 menit, setelah 10 menit maka tambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok

sampai homogen.

#### Larutan Sampel

Melakukan penimbangan dengan seksama serbuk clobazam 10 setara dengan 20.0 mg clobazam, serbuk clobazam dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, kemudian menambahkan 25 mL pelarut, kemudian melakukan sonikasikan selama  $\pm$  10 menit. Pipet 2.0 mL larutan, memasukkan ke dalam labu ukur 20 mL. ditambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok sampai homogen.

#### Larutan plasebo

Menimbang plasebo 341.46 mg dan memasukan dalam labu ukur 100 mL, menambahkan sebanyak 25 mL pelarut, sonikasikan selama  $\pm$  10 menit, setelah 10 menit maka menambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok sampai homogen. Saring dengan kertas saring. Pipet 2.0 mL larutan, masukkan ke dalam labu ukur 20 mL. Suntikan larutan plasebo ke dalam system KCKT, ukur respons puncak utama.

#### Larutan Standar uji kesesuaian sistem (UKS)

Pipet 2.0 mL larutan induk standar, masukkan ke dalam labu ukur 20 mL. ditambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok sampai homogen. Menyuntikkan sebanyak enam kali pengulangan dengan menggunakan fase gerak komposisi terbaik yang didapat. Kemudian dilihat kondisi optimum yang memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia untuk selanjutnya akan dilakukan validasi metode analisis. Dihitung simpangan baku (RSD).

### Uji Lineraritas

Pipet larutan standar induk berturut-turut 1.6 mL, 1.8 mL, 2.0 mL, 2.2 mL dan 2.4 mL ke dalam labu takar 20 mL ditambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok sampai homogen. Sehingga menjadi larutan standar konsentrasi 80%, 90%, 100%, 110% dan 120%. Disuntikan ke dalam sistem KCKT masing-masing sebanyak 1x injeksi dengan menggunakan fase gerak optimum yang telah didapatkan. Buat kurva perbandingan konsentrasi aktual dengan konsentrasi teoritis. Kriteria keberterimaan untuk koefisien korelasi yaitu  $\geq 0.990$  (DEPKES RI, 2020).

### Uji Spesifisitas/Selektifitas

Menyuntikan secara terpisah larutan sampel simulasi 100%, larutan standar 100%,

plasebo, fase gerak dan pelarut ke dalam sistem KCKT masing-masing sebanyak 3 kali replikasi (DEPKES RI, 2020).

### Uji Akurasi

Akurasi 80%, 100%, 120% dipipet berturut-turut sebanyak 1.6 mL, 2.0 mL, 2.4 mL larutan induk standar clobazam dan 2.4 mL, 2.0 mL, 1.6 mL larutan plasebo induk, memasukkan dalam labu ukur 20 mL menambahkan pelarut hingga tanda batas kemudian homogenkan. Lakukan 3 kali replikasi setiap konsentrasinya. Kriteria keberterimaan untuk akurasi yaitu perolehan kembali 98 – 102 % dan RSD luas area  $\leq 2.0$  %.

### Uji Presisi keberulangan dan presisi antara

Pipet 2.0 mL larutan induk standar dan 2.0 mL larutan plasebo. Disuntikkan secara terpisah larutan sampel simulasi 100% ke dalam sistem KCKT sebanyak 6 kali replikasi dengan menggunakan fase gerak optimum yang telah didapatkan. Lakukan pembuatan larutan standar induk dan plasebo oleh analis lain untuk mendapatkan hasil presisi antara. Kriteria keberterimaan : Perolehan kembali :98-102% dan %RSD luas area  $\leq 2.0$ .

### Uji Ketahanan (Robustness)

Melakukan uji presisi keberulangan setelah sampel disimpan selama 24 jam dan menggunakan larutan standar, fase gerak dan pelarut yang disimpan juga selama 24 jam dan tertutup rapat disimpan ditempat yang terhindar sinar matahari. Kriteria keberterimaan: Perolehan kembali: 98-102% dan %RSD luas area  $\leq 2.0$ .

### Uji LOD dan LOQ

Menghitung uji LOD dan LOQ berdasarkan rata-rata kemiringan garis dan simpangan baku *intersept* kurva standar, diperoleh dari data pengujian linieritas untuk penentuan standar deviasi dari respon dengan LOD = 3.3 (SD/S) dan LOQ = 10 (SD/S).

### Hasil dan Pembahasan

Klobazam, juga dikenal sebagai 7-kloro-1-metil-5-fenil-1,5 benzodiazepin (Gauthier & Mattson, 2015), memiliki dua cincin benzena yang membuatnya memiliki struktur semi-polar. Fase diam non-polar (kolom C18) digunakan untuk memastikan pemisahan yang tepat. Klobazam dipisahkan menjadi tablet

menggunakan fase balik karena fase diam non-polar memerlukan fase gerak semi-polar, yang sebanding dengan karakteristik sampel. Air dan asetonitril, pelarut organik dengan resolusi yang baik dalam sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), merupakan fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini. Penyebabnya karena setonitril bersifat semi-polar dan memiliki viskositas rendah 0,346 cP, asetonitril dipilih sebagai fase gerak untuk mengurangi tekanan pada kolom KCKT.

Penelitian tentang sifat-sifat HPLC dalam analisis IAA oleh Rosydiati (2019) menunjukkan bahwa nilai faktor tailing minimum, nilai k mendekati 2, dan periode retensi kurang dari 10 menit dianggap sebagai pemisahan yang efektif dan efisien. Menurut Kristiana dan Tampubolon (2022), nilai-nilai ini memenuhi kriteria kromatogram yang baik dalam analisis HPLC. Temuan ini digunakan untuk menentukan parameter ideal untuk fase gerak dan kolom yang akan digunakan dalam proses pemisahan klobazam (Tabel 4).

**Tabel 1.** Hasil injeksi sampel dengan fase gerak perbandingan Acetonitrile : Air dengan kolom C18 150 x 3 mm 3  $\mu$ m

| Variasi fase gerak (mL) | Waktu retensi (menit) | Tailing factor | Plate count |
|-------------------------|-----------------------|----------------|-------------|
| 10:90                   | 1.18                  | 0.79           | 229.46      |
| 20:80                   | 1.20                  | 1.04           | 677.06      |
| 30:70                   | 1.27                  | 1.06           | 942.06      |
| 40:60                   | 1.53                  | 1.16           | 1344.72     |
| 50:50                   | 3.60                  | 1.59           | 1923.0      |
| 60:40                   | 2.47                  | 1.46           | 1316.6      |
| 70:30                   | 1.96                  | 1.48           | 1443.8      |
| 80:20                   | 1.69                  | 1.34           | 1711.5      |
| 90:10                   | 1.56                  | 1.21           | 1470.1      |

Hasil penelitian menggunakan kolom C18 125 x 4 mm 5  $\mu$ m mendapatkan hasil waktu retensi 1.37 menit dengan perbandingan Asetonitril: Air (90:10), (80:20) dengan retensi waktu 1.50 menit dan perbandingan (70:30) dengan retensi waktu 1.73 menit. Apabila di lihat dari waktu retensi memang dihasilkan waktu yang cepat kurang dari 10 menit. Tetapi dilihat dari plate count yang didapat masih kurang efisien karena angka plate count yang di dapat  $\leq 1500$ , karena semakin tinggi angka lempeng teoritis dalam kolom maka semakin baik kemampuan pemisahan kolom.

Menggunakan kolom C18 150 x 3 mm 3  $\mu$ m mendapatkan hasil waktu retensi 1.56

menit dengan perbandingan Asetonitril: Air (90:10), (80:20) dengan retensi waktu 1.69 menit dan perbandingan (70:30) dengan retensi waktu 1.96, hasil penelitian dengan menggunakan kolom ini dikatakan lebih baik bandingkan dengan kolom 125 x 4 mm 5 um. Selain hasil waktu retensi yang cepat didapatkan faktor tailing dan angka plate count yang tinggi 1711.5 pada variasi fase gerak 80 : 20 acetonitrile : air.

**Tabel 2.** Hasil injeksi sampel dengan fase gerak perbandingan Acetonitrile : Air dengan kolom C18 125 x 4 mm 5  $\mu$ m

| Variasi fase gerak (mL) | Waktu retensi (menit) | Tailing factor | Plate count |
|-------------------------|-----------------------|----------------|-------------|
| 10:90                   | NA                    | NA             | NA          |
| 20:80                   | NA                    | NA             | NA          |
| 30:70                   | 15.13                 | 2.33           | 565.6       |
| 40:60                   | 5.39                  | 3.57           | 224.8       |
| 50:50                   | 3.19                  | 1.00           | 1001.0      |
| 60:40                   | 2.17                  | 1.55           | 937.9       |
| 70:30                   | 1.73                  | 1.21           | 1087.3      |
| 80:20                   | 1.50                  | 1.29           | 1085.6      |
| 90:10                   | 1.37                  | 1.16           | 1028.6      |

Apabila melihat dari ukuran partikel kolom, efisiensi pemisahan semakin meningkat apabila ukuran partikel bahan pengemas semakin kecil dengan di dukung laju alir yang optimal. Ukuran partikel yang semakin kecil menghasilkan puncak yang sempit dan lebih efisien sehingga meningkatkan sensitivitas. Dilihat dari hasil waktu retensi yang didapatkan, faktor tailing dan plate count sehingga digunakan kolom dengan ukuran 150 x 3 mm 3 um dengan fase gerak acetonitrile : air perbandingan (80:20).

### Hasil Uji Kesesuaian Sistem

Hasil UKS analisa clobazam tablet dengan fase gerak komposisi perbandingan Acetonitrile: Air (80:20) kolom 150 x 3 mm 3um dengan menunjukan puncak kromatogram muncul di menit ke 1.86 dengan angka plate count 5629.56 dan nilai faktor tailing 1.44 (Tabel 3). Nilai N yang besar menunjukan efisiensi kolom tersebut baik, faktor tailing di dapatkan  $\leq 2.0$  yang menunjukan bahwa bentuk puncak yang di hasilkan simetri (tidak berekor). Pengujian kesesuaian sistem sebelum melakukan analisa harus dilakukan. Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk memastikan bahwa kinerja sistem KCKT tersebut memadai untuk dilakukannya analisa, mendukung untuk validasi metode analisa,

meningkatkan keterpercayaan hasil analisa yang di peroleh (USP, 2014). Semakin besar nilai N (efisiensi kolom) maka semakin baik pemisahannya karena puncak yang dihasilkan akan semakin tajam (Kurve *et al.*, 2015).

**Tabel 3.** Hasil uji standar fase gerak Acetonitrile: Air (80:20) kolom 150 x 3 mm 3um

| Nama sampel | RT    | Luas area | Tailing factor | Plate count |
|-------------|-------|-----------|----------------|-------------|
| STD 1       | 1.86  | 1706240   | 1.44           | 5738.99     |
| STD 2       | 1.85  | 1719001   | 1.45           | 5532.80     |
| STD 3       | 1.87  | 1719164   | 1.43           | 5704.54     |
| STD 4       | 1.86  | 1723344   | 1.45           | 5620.11     |
| STD 5       | 1.87  | 1728551   | 1.44           | 5551.37     |
| STD 6       | 1.87  | 1721457   | 1.44           | 5682.85     |
| Rata-rata   | 1.86  | 1719626   | 1.44           | 5629.56     |
| SD          | 0.008 | 7438.021  | 0.01           | 84.30       |
| % RSD       | 0.439 | 0.433     | 0.52           | 1.50        |

### Akurasi

Hasil akurasi penelitian ini dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% *recovery*). Data pada tabel 4, 5 dan 6 menunjukkan bahwa uji akurasi yang dilakukan memperoleh persen perolehan kembali untuk konsentrasi 80%, 100% dan 120% berturut-turut dengan hasil 98.24%, 100.68% dan 100.52% dengan persen simpangan baku relatif kurang dari 2.0%. Hal tersebut telah sesuai dengan persyaratan uji akurasi dalam bidang farmasi yaitu 98-102% (Farmakope Indonesia 2020).

**Tabel 4.** Hasil uji akurasi 80 %

| Ulangan ke- | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | 1350994                   | 1719626                    | 98.20               |
| 2           | 1352038                   |                            | 98.28               |
| 3           | 1351361                   |                            | 98.23               |
| Rata-rata   |                           |                            | 98.24               |
| SD          |                           |                            | 0.03                |
| RSD         |                           |                            | 0.03                |

Akurasi merupakan parameter paling penting yang harus dipenuhi oleh suatu metode analisis. Pengujian akurasi merupakan pengujian untuk mengetahui apakah metode analisis yang digunakan mampu menghasilkan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang baik. Nilai perolehan kembali yang dihasilkan menunjukkan seberapa dekat hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (Kristiana & Tampubolon, 2022).

**Tabel 5.** Hasil uji akurasi 100 %

| Ulangan ke- | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | 1730147                   | 1719626                    | 100.61              |
| 2           | 173562                    |                            | 100.93              |
| 3           | 1728145                   |                            | 100.50              |
| Rata-rata   |                           |                            | 100.68              |
| SD          |                           |                            | 0.18                |
| RSD         |                           |                            | 0.18                |

Penelitian yang pernah dilakukan oleh Kristiana & Tampubolon (2021) dan Isnaeni & Dwiriani (2023) mendapatkan hasil kemurnian yaitu 99,47% dengan menggunakan KCKT-DAD apabila di bandingkan dengan hasil penelitian ini di dapatkan rata- rata perolehan kembali 99.81 % sehingga dapat disimpulkan hasil yang didapat sama dengan penelitian ini.

**Tabel 6.** Hasil uji akurasi 120 %

| Ulangan ke- | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | 2070479                   | 1719626                    | 100.34              |
| 2           | 2070375                   |                            | 100.33              |
| 3           | 2082258                   |                            | 100.91              |
| Rata-rata   |                           |                            | 100.52              |
| SD          |                           |                            | 0.27                |
| RSD         |                           |                            | 0.27                |

### Spesifisitas/Selektifitas

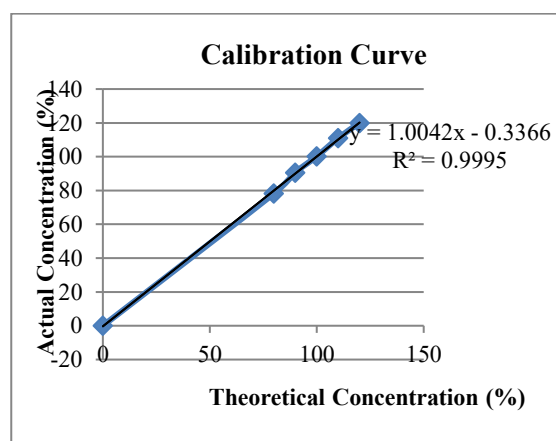
Kemampuan suatu teknik analisis untuk mengidentifikasi analit spesifik dalam sampel tanpa terpengaruh oleh keberadaan pengotor dikenal sebagai spesifisitas atau selektivitas. Pemisahan pelarut, fase gerak, dan plasebo yang disuntikkan tidak dapat dipengaruhi oleh absorbansi yang teramati selama periode retensi, sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 7. Hal ini menunjukkan bahwa pemisahan senyawa klobazam tidak terpengaruh atau terganggu oleh pelarut, fase gerak, atau plasebo. Plasebo yang di injeksikan tidak terdeteksi absorbansi nya karena plasebo tidak larut dengan menggunakan pelarut acetonitrile : air (50:50), sehingga pada saat preparasi dilakukan penyaringan untuk memisahkan partikel padat yang tidak larut dari partikel cair (*filtrate* plasebo).

**Tabel 7.** Hasil uji spesifisitas/selektifitas

| Nama sampel | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| Pelarut 1   | 0                         | 0                          | 0                   |
| Pelarut 2   | 0                         | 0                          | 0                   |
| Pelarut 3   | 0                         | 0                          | 0                   |
| MPS 1       | 0                         | 0                          | 0                   |
| MPS 2       | 0                         | 0                          | 0                   |
| MPS 3       | 0                         | 0                          | 0                   |
| Plasebo1    | 0                         | 0                          | 0                   |
| Plasebo2    | 0                         | 0                          | 0                   |
| Plasebo3    | 0                         | 0                          | 0                   |
| Sampel 1    | 1729582                   | 1719626                    | 100.58              |
| Sampel 2    | 1727333                   | 1719626                    | 100.45              |
| Sampel 3    | 1746420                   | 1719626                    | 101.56              |

### Lineritas

Uji linearitas menunjukkan bahwa suatu teknik analisis dapat merespons secara proporsional atau linear terhadap konsentrasi analit dalam sampel dalam rentang konsentrasi tertentu (Rambla-Alegre *et al.*, 2012). Hasil uji linearitas menunjukkan nilai  $> 0,999$ , yang memenuhi kriteria  $\geq 0,990$ . Linearitas yang baik ditunjukkan oleh nilai koefisien korelasi yang mendekati satu (Rambla-Alegre *et al.*, 2012). Plot kalibrasi pada rentang konsentrasi clobazam 0.032 – 0.048 mg/ml menunjukkan koefisien korelasi yang dapat diterima. Batas kuantifikasi (LOQ) dan batas determinasi (LOD) dihitung berdasarkan persamaan di dapatkan hasil LOD 0.0014 mg/mL dan LOQ 0.0042 mg/mL.



**Gambar 1.** Hasil Uji Linieritas

### Presisi

Simpangan baku relatif dari beberapa sampel yang secara statistik berbeda secara substansial biasanya digunakan untuk menunjukkan presisi, yang merupakan ukuran keterulangan suatu metode analisis (Gandjar & Rohman, 2012). Angka simpangan baku relatif (SBR) digunakan untuk menyatakan presisi, dan



angka tersebut harus kurang dari 2%. Tiga kriteria digunakan untuk menilai presisi suatu metode analisis: keterulangan, reproduktifitas, dan presisi antara (ICH, 2005).

#### Presisi Keberulangan

Tiga konsentrasi sampel, masing-masing diukur tiga kali, atau satu konsentrasi dengan enam replikasi pada konsentrasi 100% dapat digunakan untuk pengujian pengulangan (ICH, 2005) (Tabel 7). Penelitian ini melakukan uji presisi dengan satu konsentrasi yaitu konsentrasi 100% yang diinjeksikan sebanyak enam kali pengulangan pada sistem KCKT. Didapatkan hasil presisi keberulangan yaitu nilai RSD 0,57%. Hasil tersebut telah sesuai dengan persyaratannya yaitu  $\leq 2.0\%$ .

**Tabel 7.** Hasil uji presisi keberulangan

| Ulangan ke- | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | 1738902                   | 17196262                   | 101.12              |
| 2           | 1737757                   |                            | 101.05              |
| 3           | 1724961                   |                            | 100.31              |
| 4           | 1739685                   |                            | 101.17              |
| 5           | 1721699                   |                            | 100.12              |
| 6           | 1717700                   |                            | 99.89               |
| Rata-rata   |                           |                            | 100.61              |
| SD          |                           |                            | 0.57                |
| RSD         |                           |                            | 0.57                |

#### Presisi Antara

Presisi menengah menunjukkan nilai presisi metode analisis dalam berbagai kondisi dan lingkungan (Kondratova, 2017). Setidaknya dua variasi digunakan dalam proses pengujian, seperti analisis yang berbeda, hari yang berbeda, atau peralatan yang berbeda (Betz *et al.*, 2011).

**Tabel 9.** Hasil uji presisi antara analisis 1

| Ulangan ke- | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | 1738257                   | 1719626                    | 101.08              |
| 2           | 1735769                   |                            | 100.94              |
| 3           | 1719500                   |                            | 99.99               |
| 4           | 1734361                   |                            | 100.86              |
| 5           | 1730456                   |                            | 100.63              |
| 6           | 1729079                   |                            | 100.55              |
| Rata-rata   |                           |                            | 100.68              |
| SD          |                           |                            | 0.39                |
| RSD         |                           |                            | 0.39                |

Parameter presisi menengah dilakukan pada hari yang berbeda dan dengan parameter analisis yang bervariasi. Tujuan presisi menengah ini adalah untuk memverifikasi bahwa teknik analisis akan menghasilkan hasil yang sebanding di berbagai fasilitas dan analisis. Hasil uji presisi antara analisis 1 yaitu 0.39%. Hasil ini sudah sesuai dengan persyaratan Farmakope Indonesia VI (2020) yaitu  $\leq 2.0\%$ .

**Tabel 10.** Hasil uji presisi antara analisis 2

| Ulangan ke- | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | 1751992                   | 1748769                    | 100.18              |
| 2           | 1730346                   |                            | 98.95               |
| 3           | 1735548                   |                            | 99.24               |
| 4           | 1745766                   |                            | 99.83               |
| 5           | 1737358                   |                            | 99.35               |
| 6           | 1730422                   |                            | 99.35               |
| Rata-rata   |                           |                            | 99.42               |
| SD          |                           |                            | 0.50                |
| RSD         |                           |                            | 0.50                |

Hasil uji presisi antara analisis 2 yaitu 0.50%. Hasil ini sudah sesuai dengan persyaratan Farmakope Indonesia VI (2020) yaitu  $\leq 2.0\%$ . Hasil uji presisi antara analisis 1 dan Analisis 2 yaitu 0.78 %. Berarti tidak adanya perbedaan hasil meskipun sampel di preparasi oleh analisis berbeda dan hasil yang di dapat tetap konsisten meskipun terdapat variasi kondisi preparasinya. Hasil %RSD yang di dapat ini sudah sesuai dengan persyaratan Farmakope Indonesia VI (2020) yaitu  $\leq 2.0$ .

**Tabel 14.** Hasil uji presisi antara analisis 1 dan analisis 2

| Ulangan ke- | % Hasil analisis 1 | % Hasil analisis 2 |
|-------------|--------------------|--------------------|
| 1           | 101.08             | 100.18             |
| 2           | 100.94             | 98.95              |
| 3           | 99.99              | 99.24              |
| 4           | 100.86             | 99.83              |
| 5           | 100.63             | 99.35              |
| 6           | 100.55             | 98.95              |
| Rata-rata   | 100.05             |                    |
| SD          | 0.78               |                    |
| RSD         | 0.78               |                    |

#### Robustness (Ketahanan)

Uji *Robustness* adalah prosedur yang digunakan untuk menilai kemampuan metode analisis dalam mempertahankan hasil analisis di bawah variasi kecil dalam kondisi pengujian (Peris-Vicente *et al.*, 2015). Membandingkan

hasil uji dalam keadaan umum dengan hasil uji di bawah variasi kecil, seperti variasi pH, suhu, laju alir, komponen fase gerak, atau variabel lainnya, adalah bagaimana uji ketahanan dilakukan (Agrahari & Youan, 2012). Untuk mengevaluasi ketahanan temuan penelitian, larutan standar baru digunakan dan larutan sampel disimpan selama sehari penuh. Ketika membandingkan area sampel pada jam ke-0 dan ke-24, hasilnya tidak menunjukkan perubahan yang nyata. Fase gerak penelitian dapat digunakan selama 24 jam, menurut nilai perolehan kembali 99,07% dengan RSD 0,56%.

**Tabel 12.** Hasil uji ketahanan

| Ulangan ke- | Luas area sampel (Au-Min) | Luas area standar (Au-Min) | % Perolehan kembali |
|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | 1751575                   | 1753585                    | 99.89               |
| 2           | 1741672                   |                            | 99.32               |
| 3           | 1733087                   |                            | 98.83               |
| 4           | 1729587                   |                            | 98.63               |
| 5           | 1742145                   |                            | 99.35               |
| 6           | 1725415                   |                            | 98.39               |
| Rata-rata   |                           |                            | 99.07               |
| SD          |                           |                            | 0.55                |
| RSD         |                           |                            | 0.56                |

## Kesimpulan

Perbedaan komposisi fase gerak dan ukuran partikel kolom sangat mempengaruhi karakteristik kromatogram yang dihasilkan pada analisis KCKT. Hasil penggunaan fase gerak perbandingan Acetonitrile: Air (80 : 20) dengan kolom C18 150 x 3 mm 3 µm mendapatkan hasil lebih baik dibandingkan Acetonitril : Air dengan kolom C18 125 x 4 mm 5 µm, dilihat dari waktu retensi yang di dapat <10 menit dan plate count yang tinggi, kadar klobazam diukur dengan menggunakan metode KCKT dan diperoleh hasil validasi metode analisa terhadap akurasi, presisi, selektivitas, ketangguhan didapatkan RSD < 2%, Batas Deteksi (LOD) 0.0014 mg/mL dan batas kuantifikasi (LOQ) 0.0042 mg/mL. Hasil uji linearitas didapat koefisien korelasi 0.999 di tarik dari titik 0, sehingga menyatakan validasi metode analisa memenuhi syarat yang di tetapkan untuk setiap parameter validasi sesuai dengan syarat FI VI tahun 2020.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih peneliti ucapkan kepada salah satu perusahaan farmasi di Sukabumi dan

Program Studi Kimia, Universitas Muhammadiyah Sukabumi yang telah membantu peneliti dalam menyelesaikan penelitian ini.

## Referensi

- [DEPKES RI]. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia Edisi VI*. 2020. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
- [ICH]. International Conference on Harmonization. 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Geneva: International Conference on Harmonization.
- [USP]. United State Pharmacopeia. 2014. *United States Pharmacopeia National Formulary 37 NF 32 Supplement 1*. Rockville, Md: United State Pharmacopeial Convention.
- Agrahari, V., & Youan, B. B. C. (2012). Sensitive and rapid HPLC quantification of tenofovir from hyaluronic acid-based nanomedicine. *AAPS PharmSciTech*, 13(1), 202-210. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-011-9735-6>
- Agustina, S.Gz., M.Si, Nur Khoiriyah, S.Gz., M. S. (2022). *Pendidikan Ilmu Gizi*. Bandung: Media Sains Indonesia
- Aulia, S. S., & Muchtaridi, M. (2016). Penetapan Kadar Simvastatin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Farmaka*, 14(4), 70-78. <https://doi.org/10.24198/jf.v14i4.10460.g5072>
- Betz, J. M., Brown, P. N., & Roman, M. C. (2011). Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. *Fitoterapia*, 82(1), 44-52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20884340/>
- Fertiasari, R., Leni, L., & Kristiandi, K. (2023). Analisis Hidrokuinon pada Kosmetik Cair Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Media Ilmiah Kesehatan Indonesia*, 1(1), 6-11. <https://doi.org/10.58184/miki.v1i1.85>
- Gandjar, IG., & Rohman, A. (2012). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous,

- p applications and their validation parameters.
- Chromatographia*
- , 76(21), 1365-1427.
- 
- <https://link.springer.com/article/10.1007/s10337-013-2477-8>
- Isnaeni, N., & Dwirini, N. (2023). Studi dan Karakterisasi Bahan Baku Resorsinol sebagai calon Baku Pembanding dan Pengembangan Metode Analisis Penetapan Kadar Resorsinol dalam Bahan Baku. *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 3(2), 107-118.  
[10.54384/eruditio.v3i2.121](https://doi.org/10.54384/eruditio.v3i2.121)
- Johnson, E. L., & Stevenson, R. (1991). Dasar Kromatografi Cair. *Kosasih Padmawinata, penerjemah. Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari: Basic Liquid Chromatography*.
- Kazakevich, Y. V., & Lobrutto, R. (2006). *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons.
- Kemenkes, R. I. (2020). Farmakope Indonesia edisi VI. *Departemen Kesehatan Republik Indonesia*, 2371.
- Kristiana, E., & Tampubolon, W. S. B. (2022). Karakterisasi dan Uji Kemurnian Klobazam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Sebagai Baku Pembanding Farmakope Indonesia. *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 2(2), 33-43.  
[10.54384/eruditio.v2i2.122](https://doi.org/10.54384/eruditio.v2i2.122)
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., ... & Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica chimica acta*, 870, 29-44.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25819785/>
- Nurdianto, R., Hanim, D., & Pamungkasari, E. P. (2021). Correlation between Fat Intake and Physical Activity with Quality of Life in Elderly. *Media Gizi Indones*, 16(3), 280.  
<https://doi.org/10.20473/mgi.v16i3.280-286>
- Peris-Vicente, J., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2015). Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. *Analytical separation science*, 1757-1808.  
[10.1002/9783527678129.assep064](https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064)
- Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A*, 1232, 101-109.  
[10.1016/j.chroma.2011.10.050](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.050)
- Ravisankar, P., Navya, C. N., Pravallika, D., & Sri, D. N. (2015). A review on step-by-step analytical method validation. *IOSR J Pharm*, 5(10), 7-19.  
<https://iosrphr.org/papers/v5i10/B051007019.pdf>
- Saleh, E. K. (2019). Karakterisasi Puncak Kromatogram dalam HPLC Terhadap Perbedaan Fase Gerak, Laju Alir dan Penambahan Asam. *Kandaga–Media Publikasi Ilmiah Jabatan Fungsional Tenaga Kependidikan*, 1(2).  
<https://doi.org/10.24198/kandaga.v1i2.25056.g12831>