



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Jl. Dr. Soeparno Grendeng, Purwokerto 53122
Telp (0281) 625739, 634519 Fax (0281)6257739;
Website: <http://www.lppmunsoed.ac.id>; email: lppm_unsoed@yahoo.co.id

No. : B/7280/UN23.14/PN/2019
Lamp : 1 lembar
Hal : Undangan Pemakalah

Purwokerto, 25 Oktober 2019

Yth. Bapak/Ibu **Dadan Hermawan, Anggi Rahmat Januar, Dio Ansori Nurhakim, Suwandri**

Universitas Jenderal Soedirman
Purwokerto

Dengan Hormat,

Bersama surat ini diberitahukan bahwa abstrak/makalah Bapak/Ibu/Sdr/i yang berjudul **“ANALISIS SODIUM DIKLOFENAK DALAM SAMPEL URINE MENGGUNAKAN EKSTRAKSI FASA PADAT DAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI” DITERIMA** untuk **DIPRESENTASIKAN** dalam Seminar Nasional Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan IX Tahun 2019 yang diselenggarakan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Jenderal Soedirman pada tanggal 19 - 20 November 2019 di Hotel Java Heritage Purwokerto.

Selanjutnya kami mohon kehadiran Bapak/Ibu untuk mengikuti Seminar dan mempresentasikan makalah sesuai dengan jadwal terlampir.

Demikian surat pemberitahuan ini, atas perhatian dan kerjasamanya disampaikan terimakasih.

Ketua Panitia,



Poppy Arsil, S.TP., M.T., Ph.D.

Lampiran. Susunan Acara Rangkaian Kegiatan Seminar Nasional Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan IX Tahun 2019

Hari Pertama, 19 November 2019

8-8.30 registrasi
8.30 MC memulai acara
8.40 Tari Rokyan Banyumasan
8.45 Opening MC sambutan
8.50 Lagu Kebangsaan Indonesia Raya (Dirigen Ibu Titis W)
8.55-09.30 Sambutan-Sambutan ;
 1 Ketua LPPM
 2. Rektor Unsoed (sekaligus meresmikan acara dengan kentongan)
 3. Pemberian Kenang-Kenangan atau Souvenir oleh Rektor kepada seluruh
 Invited speakers
 4. Foto bersama :
 a. Sesi Foto dengan rektor
 b. Sesi Foto dengan peserta
09.30- 9.45 Coffebreak
9.45- 11.15 Keynote Speaker Sesi 1
 Prof. Lyn Parker, Prof. Raihani dan Prof. Wiwik
 Moderator: Ibu Nuri Yeni FISIP
11.15-12.15 Paralel Sesi 1 (dibagi dalam 7 ruangan)
12.15-13.00 ISHOMA
13.00-15.00 Keynote Speaker Sesi 2
 Prof. Irwandi, Assoc. Prof Anuchita, Prof. Nguyen The Hung, dan Prof. Lukas
 Moderator: Ibu Popy Arsil
15.00-15.30 ISHOMA
15.30-18.00 Paralel Sesi 2 (dibagi 7 ruangan)

Hari Kedua, 20 November 2019

08.00-08.30	Registrasi
08.30-12.30	Sesi Paralel
12.30-13.30	ISHOMA
13.30-17.00	Sesi Paralel (lanjutan)
17.00	Penutupan



SEMINAR NASIONAL UNSOED

Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan IX

SERTIFIKAT

Diberikan kepada

DADAN HERMAWAN

sebagai

PEMAKALAH

Pada Seminar Nasional

Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan IX
yang diselenggarakan oleh LPPM Unsoed pada 19-20 November 2019



Rektor

Prof. Dr. Ir. Suwanto, M.Si

NIP. 196005051986011002



Ketua LPPM

Prof. Dr. Rifda Naufalin, S.P., M.Si

NIP. 197011211995122001

Ketua Seminar Nasional

Poppy Arsil, S.TP., M.T., PhD

NIP. 197401021999032001



“(Tema: (ilmu-ilmu murni (Matematika, Fisika, Kimia dan Biologi))

ANALISIS SODIUM DIKLOFENAK DALAM SAMPEL URINE MENGUNAKAN EKSTRAKSI FASE PADAT DAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Oleh

**Dadan Hermawan, Anggi Rahmat Januar, Dio Ansori Nurhakim, Suwandri dan
Amin Fatoni**

Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Email: dadanphd@gmail.com



ABSTRAK

Penentuan sodium diklofenak, obat anti-inflamasi non steroid, dalam sampel urin telah dikaji pada penelitian ini menggunakan ekstraksi fasa padat dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sistem KCKT yang dioptimasi menggunakan kolom cyclobond sebagai fasa diam, asetonitril:air sebagai fasa gerak dan detektor UV-Vis. Kondisi KCKT optimum diperoleh menggunakan asetonitril:air 60:40 (%v/v), laju alir 0,3 mL/menit dan panjang gelombang UV pada 282 nm. Linearitas yang sangat baik diperoleh pada rentang 5 – 40 mg/L dengan nilai $r = 0,9991$; nilai batas deteksi (LOD) sebesar 4,7 mg/L; dan nilai batas kuantitasi (LOQ) sebesar 15,7 mg/L. Kombinasi ekstraksi fasa padat dan KCKT telah diaplikasikan untuk analisis sodium diklofenak dalam sampel urine dan didapatkan perolehan kembali sebesar 90,55% (RSD = 1,17 %, $n = 3$).

Kata kunci : Kromatografi cair kinerja tinggi, Sodium diklofenak, Sampel urin.

ABSTRACT

Determination of sodium diclofenac, a non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), in urine sample has been studied in this research using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC system was optimized using cyclobond column as stationary phase, acetonitrile:water as mobile phase and UV-Vis detector. The optimized HPLC conditions were obtained using acetonitrile:water 60:40 (%v/v); flow rate of 0.3 mL/min; and UV wavelength of 282 nm. Very good linearity was achieved in the range of 5 - 40 mg/L with $r = 0.9991$; limit of detection (LOD) of 4.7 mg/L; and limit of quantitation (LOQ) of 15.7 mg/L. Combination of SPE-HPLC was successfully applied for sodium diclofenac analysis in urine sample, with average recoveries of 90.55 % (RSD = 1.17%, $n = 3$).

Keywords: High performance liquid chromatography, Sodium diclofenac, Urine sample

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sodium diklofenak adalah salah satu obat golongan *non-steroidal anti-inflammatory drug* (NSAIDs) yang digunakan untuk mengobati rasa nyeri, reumatoid arthritis, osteoarthritis maupun kondisi inflamasi lainnya. Cara kerja dari sodium diklofenak akan menghambat sintesis dari



prostaglandin yang terjadi di dalam tubuh (American Society of Health-System Pharmacists, 2004). Sodium diklofenak termasuk salah satu senyawa yang sangat populer dalam golongan NSAIDs, senyawa ini tersedia dalam sediaan obat generik dengan berbagai bentuk variasi. Contohnya tablet, kapsul, gel, cairan maupun krim. Obat ini termasuk ke dalam jenis obat yang jarang menghasilkan efek samping yang serius jika dibandingkan dengan obat-obat NSAIDs lainnya karena obat ini dapat ditoleransi dengan baik. Sodium diklofenak disebut sebagai salah satu dari berbagai jenis obat non steroid anti inflamasi yang dapat dijadikan sebagai pilihan pertama yang digunakan untuk mengobati penyakit kronis, rasa nyeri maupun peradangan.

Penggunaan sodium diklofenak sebagai anti-inflamasi dan anti nyeri tidak menutup kemungkinan dikombinasikan dengan obat-obat lain, bisa ditambahkan dengan vitamin B kompleks maupun analgesik lainnya. Untuk menghindari hal tersebut diperlukan suatu pengembangan metode analisis terkait penentuan kadar senyawa sodium diklofenak secara cepat, selektif, dan sensitif.

Sampel urine digunakan sebagai media untuk menguji kadar senyawa sodium diklofenak. Urine merupakan suatu larutan yang sangat kompleks, sebagian terdiri atas produk-produk sisa proses metabolisme. Senyawa yang terdapat dalam urine antara lain urea, kreatinin, asam urat, kalium, klorida, kalsium, senyawa organik dan anorganik yang harus dihilangkan keberadaannya karena dapat mengganggu analisis (Kintz, 2000). Teknik pemisahan yang dapat digunakan yaitu dengan ekstraksi fase padat (*solid phase extraction* atau SPE) maupun ekstraksi cair cair (*liquid-liquid extraction* atau LLE). SPE dipilih karena pemisahan fase yang lebih cepat dan mudah dilakukan, hasil ekstraksi lebih kuantitatif, serta penggunaan pelarut yang lebih sedikit (Lucci, *et al.*, 2012)

Metode yang digunakan untuk analisis sodium diklofenak telah dilakukan oleh (Amalia, *et al.*, 2011) yaitu menggunakan metode spektrofotometri ultraviolet (UV). Pada penelitian kali ini penulis mencoba mengembangkan metode analisis lain yaitu dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Saat ini KCKT merupakan teknik analisis dan pemisahan yang diterima secara luas untuk analisa bahan obat (Rohman, 2009). KCKT memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode-metode analisis yang lain, antara lain memiliki kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, kolom dapat digunakan kembali, kerusakan bahan yang dianalisis dapat dihindari dan metode ini mudah digunakan (Putra, 2004).

Pengujian suatu metode analisis perlu dilakukan untuk memastikan bahwa metode ini layak untuk digunakan sehingga dilakukan suatu validasi metode dimana validasi metode adalah suatu tindakan penelitian terhadap parameter tertentu untuk memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Suatu tes atau instrumen pengukuran dapat dikatakan memiliki validitas tinggi apabila alat tersebut menjalankan fungsi ukurnya, dan memberikan hasil ukur yang sesuai dengan



maksud dilakukannya pengukuran tersebut. Adapun parameter yang dipertimbangkan dalam validasi metode analisis antara lain linearitas, batas deteksi dan batas kuantifikasi, keseksamaan (*precision*), kecermatan (*accuracy*), dan selektifitas (Harmita, 2004). Apabila metode ini dapat dipertanggungjawabkan secara keseluruhan (linearitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, presisi, akurasi dan selektifitas) maka dapat dikatakan metode ini valid sehingga dapat digunakan untuk analisis rutin (Hendayana, 2010).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana penentuan validasi metode KCKT pada senyawa sodium diklofenak?
2. Bagaimana penetapan kadar sodium diklofenak dalam sampel urine dengan KCKT?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui validasi metode KCKT pada senyawa sodium diklofenak dalam sampel urine.
2. Mengetahui kadar sodium diklofenak dalam sampel urine dengan metode KCKT.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 8 bulan (Februari – September 2019) di Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Riset Terpadu, Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain peralatan gelas, sonikator GATELAB SK33300HP1, neraca analitik digital, seperangkat alat HPLC Hitachi L-2000 Series (Detektor: UV-Vis detector L2420, pompa: L-21130, autosampler: L-2200, software: D-2000 Elite), kolom merk Astec CYCLOBOND (I 2000) ukuran 10 cm x 2,1 mm, dan mikro pipet Fisherbrand Elite 100 – 1000 μ L.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain standar sodium diklofenak, urine, akuabides, asetonitril p.a, methanol p.a. dan asam asetat p.a.

2.3 Metode

2.3.1 Preparasi larutan induk

Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan cara 10 mg standar sodium diklofenak dilarutkan dengan metanol dalam labu takar 10 mL hingga tanda batas.



2.3.2 Preparasi larutan standar

Larutan standar 100 ppm dibuat dari larutan induk 1000 ppm dengan cara diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet kemudian diencerkan menggunakan metanol pada labu takar 10 mL hingga tanda batas. Kemudian dibuat larutan standar 5, 10, 20, dan 40 ppm dari larutan standar 100 ppm masing-masing dipipet 0,5; 1; 2; dan 4 mL menggunakan mikropipet kemudian diencerkan dengan metanol pada labu takar 10 mL hingga tanda batas.

2.3.3 Preparasi sampel

Standar sodium diklofenak 1000 ppm dibuat dengan cara 10 mg standar sodium diklofenak dilarutkan dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas menggunakan metanol. Larutan stok standar 1000 ppm dipipet 1 mL menggunakan mikropipet kemudian diencerkan dengan urine pada labu takar 10 mL hingga tanda batas.

2.3.4 Optimasi kromatografi cair kinerja tinggi

Larutan standar sodium diklofenak dianalisis menggunakan sistem KCKT. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom merk Astec CYCLOBOND (I 2000 HP-RSP, 5 μ L) ukuran 10 cm x 2,1 mm, dengan volume injeksi 5 μ L, panjang gelombang 270 nm, 276 nm, dan 282 nm, laju alir 0,3 dan variasi fase gerak asetonitril:air 60:40, 50:50, dan 40:60. Semua variasi tersebut dianalisis pada suhu kamar. Kondisi optimum ditentukan berdasarkan tinggi puncak dengan waktu retensi puncak sodium diklofenak.

2.3.5 Pembuatan kurva kalibrasi standar

Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan data yang diperoleh dari analisis larutan standar sodium diklofenak dengan metode KCKT pada kondisi optimum. Larutan standar 5, 10, 20, dan 40 ppm diinjeksikan sebanyak 5 μ L (masing-masing 3 kali) ke dalam KCKT. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva kalibrasi larutan standar sodium diklofenak.

2.3.6 Validasi metode KCKT untuk penetapan sodium diklofenak

a. Penentuan linearitas

Uji ini dilakukan dengan pembuatan kurva kalibrasi dari standar sodium diklofenak 5, 10, 20, dan 40 ppm yang dianalisis menggunakan KCKT pada kondisi optimum. Koefisien korelasi (r) dihitung dari analisis regresi linear $Y = a + bX$ pada kurva kalibrasi. Nilai r_{hitung} dibandingkan dengan r_{tabel} . Syarat linearitas dapat ditentukan dari koefisien korelasi (r) ~ 1 . Perhitungan persamaan garis menggunakan rumus:

$$Y = a + bx$$

b. Penentuan nilai *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ)

Setelah diperoleh kurva kalibrasi, konsentrasi terkecil masih terdeteksi (LOD) dan terdeteksi secara kuantitatif (LOQ) dihitung secara statistik melalui garis linear dari kurva kalibrasi standar,



setelah diperoleh simpangan baku respon analitik, dari blanko dan *slope* (b) pada persamaan garis $Y = a + bX$. Batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Simpangan baku (Sb)} = S_y/x$$

$$S_y/x = \sqrt{\frac{\sum(Y - \bar{Y})^2}{n-2}}$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \left(\frac{S_y}{x}\right)}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \left(\frac{S_y}{x}\right)}{b}$$

c. Penentuan uji presisi (Harmita, 2004)

Larutan standar sodium diklofenak 50 ppm dibuat 6 kali kemudian masing-masing larutan dianalisis menggunakan KCKT pada kondisi optimum. Uji presisi (keseksamaan) ditentukan dengan parameter Simpangan Baku (SD), RSD (*Relative Standart Deviation*) atau Koefisien Variasi (KV), dan persamaan Horwithz (HORRAT). Apabila nilai RSD yang didapat dari percobaan $< 2\%$ maka hasil tersebut menunjukkan bahwa metode ini memiliki keterulangan yang masih dapat diterima dengan baik. Nilai RSD dihitung menggunakan rumus Simpangan Baku (SD), yaitu:

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

Setelah diperoleh nilai simpangan baku kemudian ditentukan nilai koefisien variasi (KV) untuk mengetahui ketelitian uji presisi ini menggunakan rumus:

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

$$\text{KV Teoritik} = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Selanjutnya ditentukan nilai HORRAT untuk mengetahui valid atau tidaknya uji presisi ini menggunakan rumus:

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{KV percobaan}}{\text{KV teoritik}}$$

d. Penentuan uji akurasi (Harmita, 2004)

Larutan sampel sodium diklofenak sebanyak 25 mL dianalisis (3 kali) menggunakan KCKT pada kondisi optimum. Akurasi dapat dihitung melalui persen perolehan kembali (*recovery*) dengan rumus:

$$\text{Persen Perolehan kembali} = \frac{C_F - C_A}{C_A} \times 100\%$$

e. Selektivitas (Spesifitas) (Hendayana, 2006)

Hasil kromatogram standar sodium diklofenak dan sampel harus menunjukkan waktu retensi yang sama dan pada daerah sekitar waktu retensi sodium diklofenak tersebut tidak boleh ada



gangguan. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan faktor selektivitas (α). Faktor selektivitas dapat diartikan sebagai ukuran keterpilihan dua komponen campuran yang dipisahkan dirumuskan sebagai berikut:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

$$k'_1 = \frac{t_{R1} - t_0}{t_0}$$

$$k'_2 = \frac{t_{R2} - t_0}{t_0}$$

2.3.7 Analisis sampel dengan ekstraksi fase padat (SPE) (Bonazzi, D. *et al.*, 1995)

Isolasi sodium diklofenak dalam sampel urine dilakukan dengan menggunakan ekstraksi fase padat (SPE). Ekstraksi fase padat ini menggunakan kolom (*cartridge*) Supelclean™ LC-18 dengan kapasitas volume sebanyak 120/100 mg. Perlakuan dimulai dengan pengkondisian alat yaitu kolom SPE dicuci terlebih dahulu dengan metanol:asam asetat 0,05% (3:7) dan aquades:asam asetat 0,05% (3:7) masing-masing 1,5 mL. Kemudian larutan sampel dimasukkan ke dalam kolom SPE dengan volume 1 mL. Larutan sampel dibilas menggunakan sebanyak 1,5 mL menggunakan aquades:asam asetat 0,05% (3:7) sebanyak 2 kali, kemudian kolom dikeringkan selama 5 menit. Kolom dielusi dengan metanol 1 mL sebanyak 3 kali kemudian ditambahkan eluen sampai 5 mL. Selanjutnya larutan digunakan untuk analisis dengan KCKT.

2.3.8 Analisis kadar sodium diklofenak dalam sampel urine dengan metode KCKT

Larutan sampel urine yang mengandung sodium diklofenak dianalisis sebanyak 3 kali menggunakan KCKT pada kondisi optimum. Kadar sodium diklofenak dalam sampel dapat ditentukan menggunakan persamaan garis regresi linier dengan koefisien korelasi yang berdasarkan kurva kalibrasi yang diperoleh.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Optimasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Pemisahan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dilakukan optimasi dengan berbagai kondisi percobaan sampai komponen-komponen dalam campuran terpisah dengan baik dan memiliki waktu analisis yang singkat. Komponen-komponen tersebut akan terpisah ketika analit melewati kolom. Kondisi optimum yang diperoleh, digunakan untuk analisis sampel sehingga dapat dibandingkan dengan standar yang dimiliki pada kondisi yang sama. Analisis pada KCKT terdiri dari 2 bagian, yaitu analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan cara melihat waktu retensi (t_R) atau posisi analit pada fase diam melalui data yang diberikan oleh kromatogram. Analit akan menghasilkan puncak pada waktu retensi yang sama dengan standar pada kondisi yang sama pula. Sedangkan analisis kuantitatif



dilakukan berdasarkan perbandingan tinggi atau luas area puncak dari analit dengan puncak larutan standar pada konsentrasi yang diketahui (Susanti & Dachriyanus, 2017).

3.1.1 Optimasi fase gerak

Optimasi fase gerak dilakukan dengan variasi perbandingan asetonitril:air yaitu 40:60; 50:50; dan 60:40 menggunakan larutan standar sodium diklofenak 20 ppm pada masing-masing pada panjang gelombang 276 nm dengan volume injeksi 5 μ L, dan laju alir 0,3 mL/menit. Hasil optimasi fase gerak ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 1 Optimasi fasa gerak pada sistem KCKT

Fase gerak (ACN:AIR)	Waktu retensi pelarut	Waktu retensi	Tinggi puncak	Luas area
40:60	1,20	5,72	22090	880643
50:50	1,16	4,24	27793	936936
60:40	1,18	3,54	32859	884425

Berdasarkan Tabel 1 diperoleh kondisi yang optimum pada fase gerak dengan perbandingan asetonitril:air 60:40. Hal ini dikarenakan pada kondisi tersebut memiliki waktu retensi yang paling cepat yaitu 3,54 dibandingkan fase gerak asetonitril:air 40:60 dan 50:50.

3.1.2 Optimasi panjang gelombang

Kondisi optimum fase gerak yaitu asetonitril:air 60:40 digunakan untuk optimasi panjang gelombang dengan variasi 270 nm, 276 nm, dan 282 nm. Hasil optimasi dari panjang gelombang ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 2 Optimasi panjang gelombang pada sistem KCKT

Panjang gelombang	Waktu retensi pelarut	Waktu retensi	Tinggi puncak	Luas area
270	1,16	4,0867	22177	699850
276	1,16	3,54	32859	884425
282	1,18	4,5267	33305	932079

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa panjang gelombang 282 nm dipilih karena memiliki puncak paling tinggi yaitu sebesar 33305, sedangkan untuk panjang gelombang 276 nm sebesar 32859 dan panjang gelombang 270 nm sebesar 22177. Hasil optimasi ini selanjutnya digunakan untuk validasi metode dalam penentuan linearitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, presisi, akurasi, selektivitas dan analisis sodium diklofenak dalam sampel urine.

3.2 Validasi Metode KCKT untuk Penetapan Sodium Diklofenak

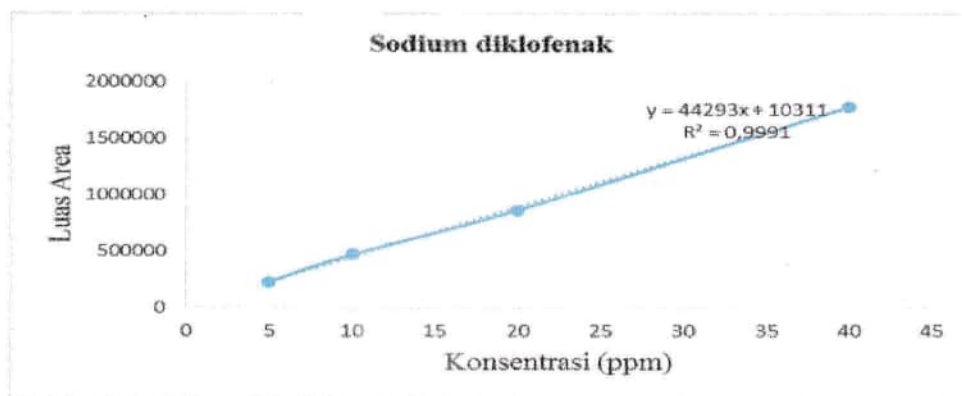
Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduktibel dan tahan pada kisaran analit yang



akan dianalisis. Secara singkat validasi merupakan konfirmasi bahwa metode analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi persoalan analisis (Susanti & Dachariyanus, 2017). Adapun untuk parameter-parameter validasi metode adalah sebagai berikut:

3.2.1 Penentuan linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi analit dengan respon yang diberikan detektor (Susanti & Dachariyanus, 2017). Linearitas ditentukan dengan pembuatan kurva kalibrasi dari standar sodium diklofenak dengan rentang konsentrasi 5, 10, 20, dan 40 ppm yang dianalisis menggunakan KCKT pada kondisi yang optimum. Hubungan linearitas antara konsentrasi dengan luas area pada puncak kromatogram dari standar sodium diklofenak dianalisis pada panjang gelombang 282 nm, laju alir 0,3 mL/menit, volume injeksi 5 μ L dengan komposisi fase gerak asetonitril:air 60:40 yang masing-masing dilakukan tiga kali pengulangan untuk diinjeksi. Data variasi konsentrasi disajikan pada Lampiran. Kurva kalibrasi standar sodium diklofenak dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Kurva kalibrasi standar sodium diklofenak

Berdasarkan Gambar 1 diperoleh persamaan garis $y = 44293x + 10311$ dengan koefisien determinasi (R^2) 0,9991 dan koefisien korelasi 0,9995. Koefisien korelasi digunakan sebagai parameter adanya hubungan linier antara luas area dengan konsentrasi sodium diklofenak menggunakan analisis regresi linier $y = a+bx$. Metode analisis dikatakan memiliki ketelitian yang baik apabila nilai koefisien korelasi diperoleh $> 0,999$ (Ganjar dan Rohman, 2007) dan mempunyai koefisien determinasi $> 0,997$ (Riyanto, 2014). Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa metode tersebut dapat digunakan untuk analisis sodium diklofenak dengan hasil yang baik.

3.2.2 Penentuan nilai limit of detection (LOD) dan limit of quantification (LOQ)

Uji batas deteksi dan batas kuantifikasi dilakukan untuk mengetahui batas deteksi dan batas kuantifikasi terendah dari sampel yang masih dapat menghasilkan data dengan presisi dan akurasi



yang baik (Labib, 2013). Batas deteksi yang diperoleh dari hasil pengujian 4,7 ppm dan batas kuantifikasi sebesar 15,7 ppm. Data mengenai uji batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Parameter	Nilai
Simpangan baku (Sy/x)	69853,58
Batas deteksi (LOD)	4,7 ppm
Batas kuantifikasi (LOQ)	15,7 ppm

3.2.3 Penentuan uji presisi

Penentuan uji presisi dilakukan untuk mengetahui derajat kesesuaian antara hasil uji individu yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama (Riyanto, 2014). Uji presisi pada penelitian ini dilakukan pada kondisi optimum yang diperoleh menggunakan prinsip keterulangan (*repeatability*). Hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Hasil uji presisi

Parameter	Nilai
SD	0,23
RSD (%)	1,17
HORRAT	0,10

Berdasarkan hasil tersebut untuk uji presisi pada Tabel 4 diperoleh nilai simpangan baku relatif (RSD) sebesar 1,17% kategori teliti. Sedangkan penelitian yang dilakukan (Amalia, *et. al*, 2011) menggunakan metode spektrofotometri UV diperoleh simpangan baku relatif (RSD) sebesar 2,7%. Data tersebut menunjukkan bahwa metode analisis menggunakan KCKT memiliki presisi yang lebih baik dibandingkan metode spektrofotometri UV dikarenakan nilai yang diperoleh tidak lebih dari 2%. Nilai RSD yang diperoleh menggunakan KCKT kemudian dibandingkan dengan RSD teoritik untuk memperoleh nilai HORRAT. Keterulangan yang baik dipengaruhi juga dengan nilai HORRAT. Apabila nilai HORRAT kurang dari 1 yang berarti nilai RSD lebih kecil dibandingkan RSD teoritiknyanya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa uji presisi valid karena memiliki nilai HORRAT sebesar 0,10 atau kurang dari 1 (Riyanto, 2014).

3.2.4 Penentuan uji akurasi

Penentuan uji akurasi ini dilakukan untuk mengetahui derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya (Riyanto, 2014). Uji akurasi yang dilakukan pada penelitian kali ini berdasarkan % *recovery* dari standar sodium diklofenak yang ditambahkan pada sampel urine dengan tiga kali pengulangan. Berikut adalah hasil dari uji akurasi yang dapat dilihat pada Tabel 5.



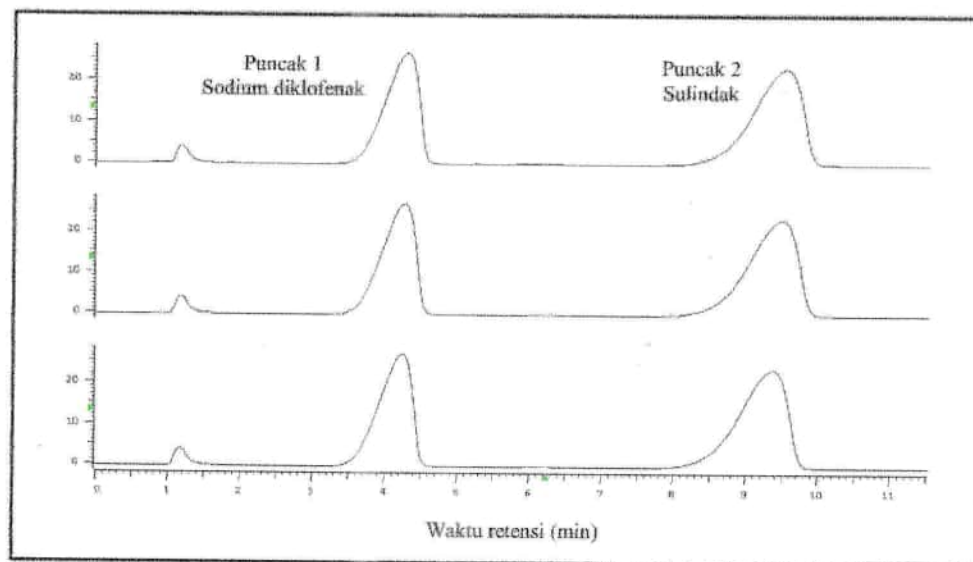
Tabel 5 Hasil uji akurasi

Parameter	Nilai
(%) recovery	90,60%
	89,37%
	91,70%
Rata-rata (%) recovery	90,55%

Berdasarkan Tabel 5 menunjukan bahwa hasil dari rata-rata (%) perolehan kembali (*recovery*) sebesar 90,55%. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh (Amalia, *et al.*, 2011) untuk analisis sodium diklofenak menggunakan spektrofotometri UV menghasilkan *recovery* sebesar 102,8. Hasil kedua analisis tersebut menunjukan tingkat akurasi yang memenuhi syarat keterimaan yaitu sebesar 80-120 % (Harmita, 2004), sehingga metode KCKT mempunyai akurasi yang baik dan dapat digunakan untuk analisis kuantitatif sodium diklofenak.

3.2.5 Penentuan uji selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan metode analisa untuk mengukur secara akurat dan spesifik suatu analit dengan adanya komponen-komponen lain yang terdapat dalam sampel (Susanti & Dachriyanus, 2017). Selektivitas ditunjukkan dengan daya pisah dua senyawa yang sejenis (Rohman, 2014). Uji selektivitas ini menggunakan senyawa sejenis sodium diklofenak yaitu sulindak yang keduanya merupakan dua senyawa golongan NSAIDs. Berikut merupakan kromatogram hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Gambar 2.



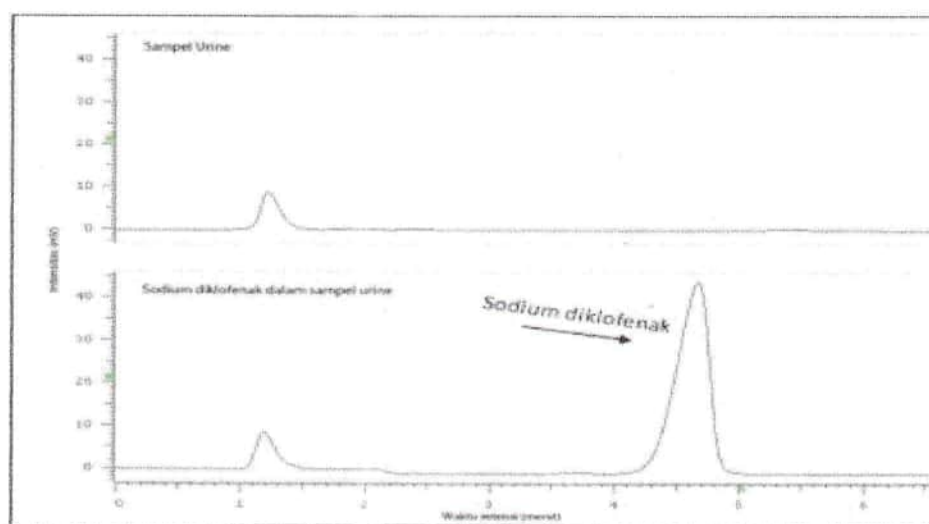
Gambar 2 Kromatogram hasil uji selektivitas standar sodium diklofenak dengan sulindak yang dianalisis pada kondisi optimum KCKT



Berdasarkan Gambar 2 diketahui bahwa puncak sodium diklofenak dengan puncak sulindak dapat terpisah dengan baik. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai selektivitas yang diperoleh lebih dari 1 yaitu sebesar 2,67. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa metode KCKT dapat selektif memisahkan senyawa yang sejenis dengan sodium diklofenak pada panjang gelombang 282 nm, fase gerak acetonitril:air 60:40, laju alir 0,3 mL/menit, dan volume injeksi 5 μ L (Susanti & Dachariyanus, 2017).

3.3 Penentuan Kadar Sodium Diklofenak dalam Sampel Urine menggunakan KCKT

Sodium diklofenak dalam sampel urine dipreparasi terlebih dahulu dengan cara standar sodium diklofenak 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 10 mg standar sodium diklofenak yang dilarutkan dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas menggunakan metanol. Larutan stok standar 1000 ppm dipipet 1 mL menggunakan mikropipet kemudian diencerkan dengan urine pada labu takar 10 mL sampai tanda batas. Kemudian dilakukan isolasi sodium diklofenak dalam sampel urine menggunakan ekstraksi fase padat (SPE). Perlakuan dimulai dengan pengkondisian alat yaitu kolom SPE dicuci terlebih dahulu dengan metanol:asam asetat 0,05% (3:7) dan aquades:asam asetat 0,05% (3:7) masing-masing 1,5 mL. Kemudian larutan sampel dimasukkan ke dalam kolom SPE dengan volume 1 mL. Larutan sampel dibilas dengan 1,5 mL aquades:asam asetat 0,05% (3:7) sebanyak 2 kali, kemudian kolom dikeringkan selama 5 menit. Kolom dielusi dengan metanol 1 mL sebanyak 3 kali kemudian ditambahkan metanol hingga 5 mL. Selanjutnya larutan digunakan untuk analisis dengan KCKT pada keadaan optimum yang telah diperoleh menggunakan panjang gelombang 282, fase gerak asetonitril:air 60:40, laju alir 0,3 mL/menit dan volume injeksi 5 μ L. Analisis kadar sodium diklofenak dilakukan 3 kali pengulangan. Berikut merupakan kromatogram hasil analisis sodium diklofenak dalam sampel urine dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 2 Kromatogram hasil analisis blanko sampel urine dan sodium diklofenak dalam urine pada kondisi optimum KCKT



Berdasarkan Gambar 4.4 diketahui bahwa sodium diklofenak dalam sampel urine memiliki waktu retensi 4,67 menit. Kadar sodium diklofenak ditentukan berdasarkan luas area puncak yang dihasilkan, dimana luas areanya digunakan kedalam persamaan regresi. Perhitungan kadar sodium diklofenak dapat dilihat pada Lampiran 5. Berdasarkan hasil tersebut diperoleh kadar sodium diklofenak sebesar 18,11 ppm dengan nilai recovery sebesar 90,55%. Nilai tersebut menunjukkan tingkat akurasi yang memenuhi syarat yaitu sebesar 80-120% (Harmita, 2004).

4 KESIMPULAN

1. Metode penentuan senyawa sodium diklofenak secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi memiliki validitas yang dapat diterima dengan parameter koefisien korelasi (r) 0,9991, batas deteksi (LOD) sebesar 4,7 ppm, batas kuantifikasi (LOQ) sebesar 15,7 ppm, nilai koefisien variasi (KV) sebesar 1,17%; HORRAT 0,1; % recovery sebesar 90,55%; serta selektivitas (α) sebesar 2,67.
2. Kadar sodium diklofenak dalam sampel urine yang dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi diperoleh sebesar 18,11 ppm

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, K. R., Sumantri, dan Maria, U. (2011). Perbandingan Metode Spektrofotometri Ultraviolet (UV) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada Penetapan Kadar Natrium Diklofenak. *Jurnal Farmasi*. Universitas Wahid Hasyim. Semarang.
- American Society of Health-System Pharmacists. (2004). AHFS Drug Information, *American Society of Health-System Pharmacists*. Inc, Bethesda.
- Bonazzi, D., V. Andrisano, R. Gatti, V. Cavrini. (1995). Analysis of pharmaceutical creams: a useful approach based on solid-phase extraction (SPE) and UV spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 13: 1321-1329.
- Gandjar, dan Rohman. (2007). *Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3):117-135.
- Hendayana, S. (2006). *Kimia Pemisahan: Metode Kromatografi dan Elektrolisis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hendayana, S. (2010). *Kimia Pemisahan: Metode Kromatografi dan Elektrolisis Modern Cetakan Kedua*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Labib, Bir Ribhil. (2013). Validasi metode penetapan Kadar Lansoprazol dalam Darah Secara In-vitro dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.



- Lucci, P., Pacetti, D., Nunez., O., & Frega, N. G. (2012). Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography-The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. 5: 127-164.
- Kintz, P. (2000). Hair, In: Jay A. S. editors. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. UK: Academic Press. 2: 598-640.
- Putra, E. D. L. (2004). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Riyanto. (2014). *Validasi & Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 1st ed*. Yogyakarta: Deepublish.
- Rohman, A. (2014). *Validasi dan Penjaminan Mutu Metode Analisis Kimia*. Yogyakarta: UGM Press.
- Susanti, M., & Dachriyanus. (2017). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Padang: Universitas Andalas.