

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Berdasarkan keputusan Permenkes No. 007 Tahun 2012 bahwa obat tradisional dilarang mengandung bahan kimia obat maupun hasil isolat yang berkhasiat sebagai obat. Jamu termasuk salah satu obat tradisional yang ditemukan campuran bahan kimia obat (BKO) didalamnya untuk mendapatkan khasiat yang lebih cepat (BPOM RI, 2015). Berdasarkan hasil pengawasan BPOM, BKO yang diidentifikasi tercampur dalam obat tradisional pada tahun 2013 (59 produk), 2014 (51 produk), 2015 (50 produk), 2016 (92 produk), dan 2017 (39 produk) sebagian besar BKO yang ditambahkan untuk penghilang rasa sakit dan rematik. Bahan tersebut diantaranya fenilbutazon dan natrium diklofenak (BPOM RI, 2016) termasuk NSAIDs (*Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs*) (Depkes RI, 2014). Kedua obat tersebut jika digunakan dalam jangka panjang dapat menyebabkan korosi lambung, tukak lambung akut atau kronik, pendarahan lambung, gagal ginjal (Syarif, dkk., 2001), dan kerusakan hati yang parah (Tjay dan Rahardja, 2007). Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis penetapan kadar bahan kimia obat dalam obat tradisional menggunakan metode yang akurat, tepat dan sensitif. Salah satu metode tersebut yaitu KCKT.

Metode KCKT dapat digunakan untuk penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak dengan fenilbutazon baku pembanding farmakope indonesia (BPFI) untuk fenilbutazon, sedangkan natrium diklofenak BPFI untuk natrium diklofenak sebagai baku pembanding (Depkes RI, 2014).

Jedziniak dkk, (2005) melaporkan bahwa pengukuran kadar fenilbutazon dan oxyphentazone dalam plasma sapi menggunakan KCKT dengan deteksi UV-Vis. Fase diam yang digunakan C_{18} dan fase gerak yang digunakan asetonitril dan asam asetat (1:1) dengan laju alir 1,2 mL/menit, deteksi dilakukan pada panjang gelombang 240 nm memenuhi parameter validasi.

Jannah (2014) melakukan validasi metode KCKT untuk menetapkan kadar natrium diklofenak dalam plasma dan sediaan tablet serta melihat adanya interferensi vitamin B1 terhadap penetapan natrium diklofenak. Sistem KCKT yang dikembangkan menggunakan kolom *Lichrospher*, fase gerak campuran metanol dan asam asetat 0,12% (65:35 v/v) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit, deteksi dilakukan pada panjang gelombang 281 nm menghasilkan presisi, akurasi dan linieritas yang baik.

Lathif dkk, (2013) telah melakukan analisis fenilbutazon dan natrium diklofenak dalam jamu pegal linu di Surakarta. Penelitian yang dilakukan secara kualitatif menggunakan KLT ditemukan adanya fenilbutazon dan natrium diklofenak dalam jamu pegal linu. Sedangkan secara kuantitatif menggunakan metode Spektrofotometri UV dengan fase gerak terdiri dari tiga sistem berbeda memenuhi parameter presisi.

Suharyono (2017) melakukan validasi dalam penetapan kadar Natrium diklofenak dalam obat tradisional pegal linu menggunakan KCKT dengan deteksi UV-Vis. Fase diam yang digunakan C_{18} dan Fase gerak yang digunakan campuran asetonitril dan dapar fosfat (pH 3,5) (70:30 v/v), laju alir 1 mL/menit dengan

panjang gelombang 254,9 nm memenuhi parameter akurasi, presisi, linearitas, selektivitas dan sensitivitas.

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, belum ada laporan penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak dalam obat tradisional pegal linu menggunakan metode KCKT. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak menggunakan KCKT dan mengaplikasikannya pada obat tradisional pegal linu yang ditambahkan fenilbutazon dan natrium diklofenak. Validasi metode meliputi parameter ketelitian, ketepatan, selektivitas (spesifisitas), linieritas dan sensitivitas (LOD/LOQ). Fase diam yang digunakan adalah C_{18} dan fase gerak berupa campuran asetonitril dan dapar asetat pH 4,6 (45:55 v/v) (Depkes RI, 2014).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat disusun rumusan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak menggunakan KCKT dengan fase diam C_{18} dan fase gerak campuran asetonitril dan dapar asetat pH 4,6 (45:55 v/v) dapat dilakukan?
2. Apakah uji validasi pada metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas, dan sensitivitas?
3. Apakah metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan dalam sediaan obat tradisional pegal linu yang ditambahkan fenilbutazon dan natrium diklofenak?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Melakukan validasi metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak menggunakan KCKT dengan fase diam C_{18} dan fase gerak campuran asetonitril dan asam asetat pH 4,6 (45:55 v/v) dapat dilakukan.
2. Melakukan validasi pada metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas, dan sensitivitas.
3. Mengaplikasikan metode yang telah divalidasi pada sediaan obat tradisional pegal linu yang ditambahkan fenilbutazon dan natrium diklofenak.

D. Manfaat Penelitian

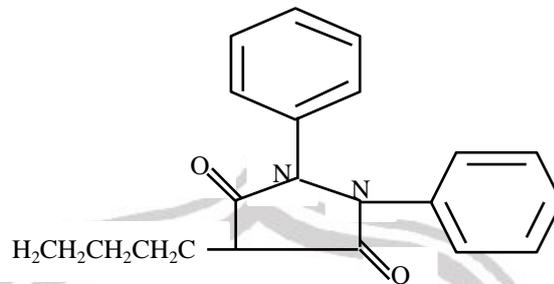
Penelitian ini diharapkan memberikan informasi ilmiah tentang metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak menggunakan KCKT yang telah tervalidasi dan dapat digunakan sebagai acuan untuk analisis campuran fenilbutazon dan natrium diklofenak dalam sediaan obat tradisional pegal linu.

E. Tinjauan Pustaka

1. Fenilbutazon

Fenilbutazon (Gambar 1.) mempunyai rumus molekul $C_{19}H_{20}N_2O_2$ dengan berat molekul 308,37 g/mol. Nama kimia dari fenilbutazon adalah asam 4-butyl-1,2-difenil-3,5-pirazolidinadion. Fenilbutazon mengandung tidak kurang dari 98% dan tidak melebihi dari 102% $C_{19}H_{20}N_2O_2$ dihitung sejak bahan dikeringkan. Pemerianya berupa serbuk hablur, putih atau agak

putih, tidak berbau. Kelarutan fenilbutazon yaitu sangat sukar larut dalam air, mudah larut dalam aseton dan eter, larut dalam etanol (Depkes RI, 2014).



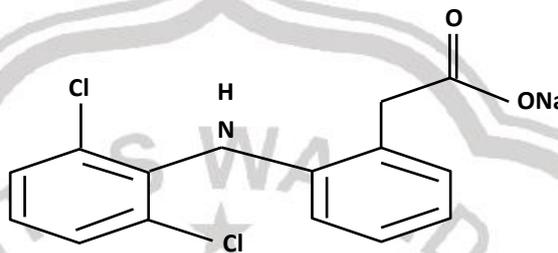
Gambar 1. Struktur Kimia Fenilbutazon (Depkes RI, 2014)

Fenilbutazon merupakan derivat oksifenil obat golongan anti inflamasi nonsteroid (AINS) juga berdaya efek analgesik-antiterapetik tapi anti-inflamasi efek terkuat sehingga digunakan untuk pengobatan artritis reumatoid. Mekanisme kerjanya menghambat biosintesis prostaglandin (PG) dengan cara menghambat enzim siklo-oksigenase sehingga konversi asam arakidonat menjadi PGG_2 terganggu. Apabila obat ini digunakan secara terus-menerus akan menyebabkan korosi lambung, tukak lambung akut atau kronik, pendarahan lambung, bahkan pada taraf intoksikasi menimbulkan koma, trimus, kejang kronik dan klonik, syok, asisosis metabolik, depresi sumsum tulang dan gagal ginjal (Syarif dkk, 2001).

2. Natrium Diklofenak

Natrium diklofenak (Gambar 2.) mempunyai rumus molekul $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ dengan berat molekul 318,13 g/mol. Nama kimia dari natrium diklofenak adalah natrium [o-(2,6-dikloroanilino)fenil] asetat. Natrium diklofenak mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak melebihi

101,0% $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ dihitung sejak bahan dikeringkan. Pemerianaanya berupa serbuk hablur, putih hingga hampir putih, higroskopik, melebur pada suhu 284° . Kelarutan natrium diklofenak yaitu mudah larut dalam metanol, larut dalam etanol, agak sukar larut dalam air, praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam ester (Depkes RI, 2014).



Gambar 2. Struktur Kimia Natrium Diklofenak (Depkes RI, 2014)

Natrium diklofenak merupakan obat golongan anti-inflamasi nonsteroid (AINS) berdaya anti radang terkuat. Natrium diklofenak adalah bentuk garam dari diklofenak dan merupakan turunan dari fenil asetat. Obat ini sering digunakan untuk segala macam nyeri, migren dan encok (Tjay dan Rahardja, 2007). Mekanisme kerjanya menghambat biosintesis prostaglandin (PG) dengan cara menghambat enzim siklo-oksigenase sehingga konversi asam arakidonat menjadi PGG_2 terganggu. Penggunaan obat secara terus menerus akan menyebabkan korosi lambung, tukak lambung akut atau kronik, pendarahan lambung karena bersifat asam dan kerusakan hati karena dia mengalami *first-pass* efek (Syarif dkk., 2001).

3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

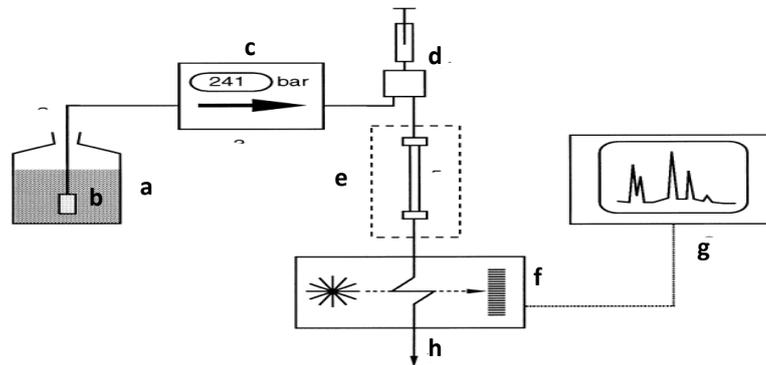
Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Hal ini karena

didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sensitif dan beragam. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) mampu menganalisis berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Depkes RI, 1995).

Kerja KCKT pada prinsipnya yaitu pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya, alatnya terdiri dari kolom (sebagai fase diam) dan larutan tertentu sebagai fase geraknya. Yang paling membedakan KCKT dengan kromatografi lainnya adalah pada KCKT digunakan tekanan tinggi untuk mendorong fase gerak (Meyer, 2004)

Kelebihan metode KCKT adalah mampu memisahkan molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, mudah melaksanakannya, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/ kerusakan bahan yang dianalisis, resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor, kolom dapat digunakan kembali dan mudah melakukan perolehan kembali (Putra, 2004). Sementara itu, jika sampelnya sangat kompleks maka resolusi yang baik sulit diperoleh, hal itu menjadi kelemahan dari metode ini (Gandjar dan Rohman, 2013).

Komponen KCKT (Gambar 3.) secara umum terdiri dari yaitu wadah fase gerak, fase gerak, pompa, injektor, kolom, detektor, *recorder* dan pembuangan (Gandjar dan Rohman, 2013).



Gambar 3. Skema Komponen KCKT; a.Wadah fase gerak; b. Fase gerak; c. Pompa; d. Injektor; e. Kolom; f. Detektor; g. Recorder; h. pembuangan (Mayer, 2004)

a. Wadah fase gerak

Wadah fase gerak merupakan suatu tempat penampung fase gerak yang harus bersih dan bersifat inert. Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien yakni komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi (Gandjar dan Rohman, 2013).

b. Fase Gerak

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur secara keseluruhan dan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel (Gandjar dan Rohman, 2013). Ada beberapa syarat yang harus dipenuhi dalam pemilihan fase gerak di antaranya yaitu viskositas, transparansi UV, reaktif indeks, titik didih, kemurnian, inert, tidak menyebabkan korosi, toksisitas, dan harga (Mayer, 2004).

c. Pompa

Pompa pada KCKT digunakan sebagai penggerak fase gerak ke dalam kolom. Pompa yang digunakan sebaiknya memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 3 mL/menit. Ada 2 tipe pompa yang digunakan yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Gandjar dan Rohman, 2013).

d. Injektor

Injektor merupakan komponen dari KCKT yang berfungsi untuk memasukan sampel. Pada waktu pengisian sampel, sampel dialirkan melalui keluk sampel dan kebawahnya dirilis ke pembuang. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan menggelontarkan sampel ke kolom (Gandjar dan Rohman, 2013).

e. Kolom

Bagian ini merupakan komponen paling penting pada proses KCKT, berhasil atau tidaknya analisis dengan KCKT bergantung pada pemilihan kolom serta kondisi penelitian. Kolom umumnya dibuat dari *stainless steel* dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu: kolom analitik dan kolom preparatif (Putra, 2004).

f. Detektor

Detektor digunakan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitifitas yang tinggi, gangguan yang rendah, kisar respons linier yang luas, dan memberi respons untuk semua tipe senyawa. Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV-Vis. Panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan kisaran yang lebih luas (Putra, 2004).

g. Recorder

Recorder merupakan suatu alat yang berfungsi mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai kromatogram (Gandjar dan Rohman, 2013). *Recorder* biasanya berupa komputer maupun alat penangkap data yang telah terprogram untuk fungsi tersebut.

4. Validasi

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium yang bertujuan untuk menunjukkan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan (Harmita, 2004).

Ada beberapa parameter validasi metode analisis yang harus dipenuhi agar suatu metode dikatakan valid. Setiap metode uji yang berbeda

memerlukan parameter validasi (Tabel I.) yang berbeda, kategori pengujian untuk data validasi terdiri dari (Depkes, 2014):

a. Kategori I

Metode uji untuk penetapan kadar komponen utama dalam bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) dalam sediaan obat jadi.

b. Kategori II

Metode uji untuk penetapan cemaran dalam bahan baku obat atau senyawa hasil degridasi dalam sediaan obat jadi yang terdiri dari prosedur kuantitatif dan uji batas.

c. Kategori III

Metode uji untuk penetapan karakteristik kinerja sediaan seperti disolusi dan pelepasan obat.

d. Kategori IV

Metode uji untuk identifikasi.

Tabel I. Parameter validasi yang dibutuhkan untuk masing-masing tipe analisis (Depkes RI, 2014)

Parameter Kerja Analisis	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Uji Batas		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Spesifitas (Selektivitas)	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas Deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas Kuantitasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linearitas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

Catatan: * Syarat tergantung sifat khusus dari uji

Parameter validasi tersebut meliputi :

a. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Presisi dapat disebut sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Syarat presisi terpenuhi apabila metode mempunyai simpangan baku relatif atau koefisien variasi tidak lebih atau sama dengan 2 % (Hermita, 2004).

Uji presisi bisa dilakukan dengan menentukan parameter RSD (*Relative Standard Deviasi*) dapat dilihat pada persamaan (Gandjar dan Rohman, 2007).

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

Keterangan :

RSD : Relatif Standar deviasi
SD : Standar Deviasi
 \bar{x} : Kadar rata-rata sampel

b. Akurasi

Akurasi merupakan suatu ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung pada sebaran kesalahan sistematis di keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu, untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi kesalahan sistematis tersebut seperti menggunakan

peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu dan pelaksanaan yang cermat, dan sesuai prosedur (Harmita, 2004). Rentang kesalahan yang diizinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks sampel terdapat pada Tabel II.

Tabel II. Nilai perolehan kembali berdasarkan besarnya konsentrasi analit (Harmita, 2014)

Analit pada matrik sampel, %	Rata-rata yang diperbolehkan, %
100	98-102
> 10	98-102
>1	97-103
> 0,1	95-105
0,01	90-107
0,001	90-107
0,000.1 (1 ppm)	80-110
0,000.01 (100 ppb)	80-110
0,000.001 (10 ppb)	60-115
0,000.000.1 (1 ppb)	40-120

Menurut ICH, uji akurasi dilakukan dengan 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Perhitungan perolehan kembali (% *recovery*) dapat ditetapkan dengan rumus (WHO, 1992).

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{A - B}{C} \times 100\%$$

Keterangan :

- A = Koensentrasi sampel setelah penambahan baku
- B = Konsentrasi sampel sebelum penambahan bahan baku
- C = Konsentrasi bahan baku yang ditambahkan

Menurut Farmakope Indonesia edisi V (2014) persentase perolehan kembali dari penetapan sejumlah analit yang ditambahkan dan diketahui jumlahnya kedalam sampel, atau selisih antara hasil rata-rata dengan hasil sebenarnya yang diterima bersama dengan batas kepercayaan. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai

presisi RSD (Hermita, 2014). Menurut Gandjar dan Rohman (2012) menyatakan bahwa rentang persentase perolehan kembali akurasi yang umum untuk senyawa campuran adalah 98-102%.

c. Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan yang hanya mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*), metode ini dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) (Hermita, 2004). Daya pisah (resolusi) antara analit yang dituju dengan pengganggu lainnya $> 1,5$ (Susanti dan Dachriyanus, 2017). Selektivitas ditentukan melalui nilai resolusinya (R) dengan rumus (Mayer, 2004).

$$R = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_1 + w_2}$$

Keterangan :

- R : resolusi
- t_{R_1} : waktu retensi puncak pertama
- t_{R_2} : waktu retensi puncak kedua
- w_1 : lebar dasar puncak pertama
- w_2 : lebar dasar puncak kedua

d. Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode yang memberikan gambaran langsung maupun melalui bantuan perhitungan matematis yang menghasilkan data yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas suatu metode dapat dilihat

menghitung regresi linear antara hasil pengukuran dan konsentrasi (Hermita, 2004).

Data berupa *slope* (b), *intercept* (a) dan koefisien korelasi (r) dari perhitungan hasil regresi linear antar hasil yang terukur dengan konsentrasi berupa $Y=bx+a$ akan memberikan gambaran tentang linearitas, nilai dari koefisien korelasi (r) merupakan parameter untuk mengetahui hubungan yang linear. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan rentang nilai $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Hermita, 2004). Sementara itu, dalam Farmakope Indonesia edisi V (2014) disebutkan bahwa linearitas terpenuhi jika koefisien korelasi ($r \geq 0,99$) kemiringan tidak harus berbeda secara bermakna dari nol.

e. Sensitivitas (kepekaan)

Sensitivitas dapat diukur dengan parameter LOD (*Limit Of Detection*) dan LOQ (*Limit Of Quantification*). Batas deteksi (LOD) yaitu konsentrasi paling rendah dalam sampel yang masih terdeteksi, tetapi tidak selalu bisa dikualifikasi. Batas deteksi (LOD) merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit berada diatas atau dibawah nilai tertentu. Sementara itu, batas kuantitasi (LOQ) yaitu konsentrasi analit paling rendah pada sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang bisa diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Nilai LOD dan LOQ diekspresikan sebagai

konsentrasi (Gandjar dan Rohman, 2013) dan keduanya bisa dihitung secara statistik dengan garis regresi linear dan kurva kalibrasi (Hermita, 2004). Semakin kecil nilai LOD dan LOQ suatu metode maka metode tersebut memiliki sensitivitas yang baik (Gandjar dan Rohman, 2007). Menurut *The United State Pharmacopeia* (2016) berdasarkan pada nilai *signal to noise* (S/N) nilai LOD = 3 dan LOQ = 10.

f. Rentang

Rentang adalah interval antara batas tertinggi dan batas terendah dari kadar analit yang telah dibuktikan, dapat ditentukan dengan presisi, akurasi dan linearitas yang sesuai menggunakan prosedur analisis yang ditetapkan. Rentang prosedur divalidasi dengan membuktikan bahwa prosedur analisis memberikan presisi, akurasi, dan linearitas yang dapat diterima ketika diterapkan pada sampel yang mengandung analit pada konsentrasi ekstrim yang berada pada rentang (Depkes RI, 2014).

5. Obat Tradisional

Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat (Depkes, 2012). Obat tradisional terdiri dari yaitu jamu, obat herbal terstandar dan fitofarmaka (BPOM, 2015).

Klaim khasiat jamu dibuktikan berdasarkan data empiris. Klaim khasiat obat herbal berstandar dibuktikan secara ilmiah atau pra-klinik. Klaim

penggunaan jamu dan obal herbal terstandar sesuai dengan tingkat pembuktian umum dan medium. Sedangkan klaim obat fitofarmaka harus dibuktikan berdasarkan uji klinik dengan tingkat pembuktian medium dan tinggi (BPOM, 2005).

F. Landasan Teori

Menurut FI edisi V (2014), fenilbutazon dan natrium diklofenak mengandung unsur elektronegatif yang menjadikan polar sehingga dapat dipisahkan dengan KCKT dan juga memiliki gugus kromofor sehingga dapat dianalisis dengan detektor UV-Vis.

Jedziniak dkk, (2005) melaporkan bahwa pengukuran kadar fenilbutazon dan oxyphentazone dalam plasma sapi menggunakan KCKT dengan deteksi UV-Vis. Fase diam yang digunakan C_{18} dan fase gerak yang digunakan asetonitril dan asam asetat (1:1) dengan laju alir 1,2 mL/menit, deteksi dilakukan pada panjang gelombang 240 nm memenuhi parameter validasi.

Jannah (2014) melakukan validasi metode KCKT untuk menetapkan kadar natrium diklofenak dalam plasma dan sediaan tablet serta melihat adanya interferensi vitamin B1 terhadap penetapan natrium diklofenak. Sistem KCKT yang dikembangkan menggunakan kolom *Lichrospher*, fase gerak campuran metanol dan asam asetat 0,12% (65:35 v/v) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit, deteksi dilakukan pada panjang gelombang 281 nm menghasilkan presisi, akurasi dan linieritas yang baik.

Lathif dkk, (2013) telah melakukan analisis fenilbutazon dan natrium diklofenak dalam jamu pegel linu di Surakarta. Penelitian yang dilakukan secara

kualitatif menggunakan KLT ditemukan adanya fenilbutazon dan natrium diklofenak dalam jamu pegal linu. Sedangkan secara kuantitatif menggunakan metode Spektrofotometri UV dengan fase gerak terdiri dari tiga dimensi berbeda memenuhi parameter presisi.

Suharyono (2017) melakukan validasi dalam penetapan kadar Natrium diklofenak dalam obat tradisional pegal linu menggunakan KCKT dengan deteksi UV-Vis. Fase diam yang digunakan C_{18} dan Fase gerak yang digunakan campuran asetonitril dan dapar fosfat (pH 3,5) (70:30 v/v), laju alir 1mL/menit dengan panjang gelombang 254,9 nm memenuhi parameter akurasi, presisi, linearitas, selektivitas dan sensitivitas.

G. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan landasan teori, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Validasi metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak dapat dilakukan menggunakan KCKT dengan fase diam C_{18} serta fase gerak berupa campuran asetonitril dan dapar asetat pH 4,6 (45:55 v/v).
2. Validasi pada metode penetapan kadar fenilbutazon dan natrium diklofenak menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas, dan sensitivitas.
3. Metode yang sudah divalidasi dapat diaplikasikan dalam sediaan obat tradisional pegal linu yang ditambahkan fenilbutazon dan natrium diklofenak.