

Karakterisasi dan Uji Kemurnian Klobazam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Sebagai Baku Pembanding Farmakope Indonesia

Endah Kristiana ^{a,1,*}, Widya Sagita Br. Tampubolon ^{a,2}, Atiek Supardiati E. S ^{a,3,*}

^aBadan Pengawas Obat dan Makanan, Jl. Percetakan Negara No. 23, Jakarta Pusat 10560

¹ endah.kristiana@pom.go.id*; ² widya.sagita@pom.go.id; ³ atiek.supardiati@pom.go.id

* corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Article history

Received: 9
Desember 2021

Revised: 26
Agustus 2022

Accepted: 19
September 2022

DOI:

<https://doi.org/10.54384/eruditio.v2i2.122>

Klobazam merupakan obat dengan nama kimia 7-kloro-1-metil-5-fenil-1,5-benzodiazepin yang digunakan untuk pengobatan berbagai jenis epilepsi. Klobazam bekerja di otak dan sistem saraf pusat untuk memberikan efek menenangkan. Untuk memaksimalkan efek terapi serta mengurangi efek toksik obat, maka perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui kadar dalam sampel obat klobazam yang memenuhi syarat. Salah satu cara pengawasan obat yaitu dengan penguatan kapasitas dan kapabilitas pengujian dengan cara pengembangan baku pembanding. Semakin banyak jenis Baku Pembanding yang dikembangkan maka akan semakin banyak sampel obat yang mampu dilakukan pengujian. Pengembangan baku pembanding ditujukan untuk menghasilkan Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI) yang dapat digunakan untuk pengujian sampel klobazam baik secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian ini bertujuan untuk menghasilkan Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI) Klobazam yang memenuhi syarat karakterisasi dan kemurnian sebagai Baku Pembanding. Karakterisasi dilakukan secara spektroskopi inframerah dengan hasil bilangan gelombang menunjukkan gugus fungsi C=C aromatik ($1490,97\text{ cm}^{-1}$), siklik keton C=O ($1670,35$ dan $1691,57\text{ cm}^{-1}$), dan amina C-N ($1330,88$ dan $1375,25\text{ cm}^{-1}$), hasil spektroskopi UV-Vis menunjukkan panjang gelombang $230,5\text{ nm}$, hasil kromatografi gas spektroskopi massa menunjukkan principal ions (m/z) klobazam adalah 207 ($\text{Cl}_3\text{H}_4\text{NO}_2$); 255,1 ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2$); 257,1 ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}$); 258,1 ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}$); dan 300 ($\text{C}_{15}\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_2$), dan spektroskopi $^1\text{HNMR}$, $^{13}\text{CNMR}$, HMQC, dan HMBC yang menunjukkan bahwa bahan baku adalah klobazam. Kemurnian Klobazam diukur menggunakan KCKT-DAD dan diperoleh purity index sebesar 1,0000 dan kemurnian sebesar 99,73% (n=20, SD=0,01%, RSD=0,01%), dan secara DSC diperoleh kemurnian sebesar 99,33% dan titik leleh sebesar $180,55^\circ\text{C}$. Semua parameter validasi metode analisis secara KCKT berupa spesifisitas/selektifitas, uji kesesuaian sistem (RSD = 0,05%), linieritas (R = 0,9997) dengan rentang 0,015% sampai 0,045%, akurasi 0,19%, dan Presisi 0,01% telah memenuhi syarat. Klobazam hasil karakterisasi dan penetapan nilai kemurnian dapat menjadi “Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI)” dan digunakan dalam uji kualitatif dan kuantitatif oleh seluruh Balai Besar/Balai/Loka POM dan stakeholder ABG (*Academic, Business, Government*).

Clobazam is a drug with the chemical name 7-chloro-1-methyl-5-phenyl-1,5-benzodiazepine, which is used to treat various types of epilepsy. Clobazam works on the brain and central nervous system to provide a calming effect. To maximize the therapeutic effect and reduce the drug's toxic effect, it is

necessary to test to determine the levels in the sample of clobazam that fulfilled requirements. One way to control drugs is to strengthen the capacity and capability of testing by developing reference standards. The more reference standards developed, the more drug samples can be tested. The development of reference standards is aimed at producing the "Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI)" which can be used for qualitative and quantitative testing of clobazam samples. This test aims to produce the clobazam "Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI)" which fulfilled the characterization and purity requirements as a reference standard. Characterization was achieved by infrared spectroscopy with the wave number results showed aromatic C=C functional groups (1490.97 cm⁻¹), C=O cyclic ketones (1670.35 and 1691.57 cm⁻¹), and C-N amines (1330.88 and 1375.25 cm⁻¹), UV-Vis spectroscopy results showed a wavelength of 230.5 nm, gas chromatography-mass spectroscopy results showed the main ion (m/z) of clobazam was 207 (C₁₃H₄NO₂); 255.1 (C₁₅H₁₁ClN₂); 257.1 (C₁₄H₉ClN₂O); 258.1 (C₁₄H₁₀ClN₂O); and 300 (C₁₅H₇ClN₂O₂), and ¹HNMR, ¹³CNMR, HMQC, and HMBC spectroscopy which showed that the raw material was clobazam. The purity of clobazam was measured using HPLC-DAD and obtained a purity index of 1.0000 and a purity of 99.73% (n=20, SD= 0.01%, RSD=0.01%), and by DSC obtained a purity of 99, 33% and a melting point of 180.55oC. All validation parameters of the HPLC analysis method were specificity/selectivity, system-appropriate test (RSD = 0.05%), linearity (R = 0.9997) with a range of 0.015% to 0.045%, accuracy 0.19%, and precision 0, 01% have fulfilled the requirements. The characterization results of clobazam and determination of purity value can be used as "Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI)" and used in qualitative and quantitative tests by all Indonesia FDA provincial offices and stakeholder ABG (Academic, Business, government).

Keywords: clobazam, characterization, Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI)

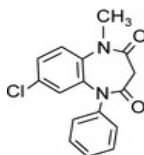
Kata Kunci: klobazam, karakterisasi, Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI).

1. Pendahuluan

Klobazam merupakan obat dengan nama kimia 7-kloro-1-metil-5-fenil-1,5-benzodiazepin yang digunakan untuk pengobatan berbagai jenis epilepsi (Gambar 1) (Gauthier & Mattson, 2015), berbentuk serbuk kristal berwarna putih atau hampir putih yang sangat larut dalam metilen klorida dan cukup larut dalam air (Tolbert & Larsen, 2018). Kandungan senyawa klobazam dalam obat perlu diketahui melalui pengujian untuk memaksimalkan efek terapi epilepsi serta mengurangi efek toksik obat. Pengujian kandungan senyawa klobazam dalam obat tidak terlepas dari peran klobazam BPFI sebagai bahan acuan.

Baku Pembanding adalah suatu bahan dengan kemurnian tertentu yang digunakan sebagai pembanding dalam pengujian suatu analit dalam sampel. Baku Pembanding kimia merupakan senyawa kimia penting yang dibutuhkan dalam pengujian, untuk menjamin validitas hasil (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2021). Baku Pembanding adalah bahan atau zat bersertifikat, dikeluarkan oleh badan tersertifikasi, menunjukkan satu atau lebih nilai sifat yang ditetapkan, dapat digunakan untuk kalibrasi peralatan, evaluasi metode pengukuran, dan penetapan nilai suatu bahan (Culbert & Johnson, 2004). Pengembangan baku pembanding merupakan salah satu bentuk pengawasan obat dalam hal penguatan kapasitas dan kapabilitas pengujian. Saat ini sebagian besar BPFI yang ditetapkan oleh Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPPOMN) diturunkan dari baku pembanding primer. Pada penelitian ini, PPPOMN berupaya menghasilkan baku pembanding primer klobazam yang nilai sifatnya dikarakterisasi secara kualitatif dan kuantitatif tanpa dibandingkan terhadap baku pembanding primer. Hal ini dilakukan untuk mengurangi ketergantungan terhadap pembelian baku pembanding primer yang digunakan dalam penetapan baku pembanding di PPPOMN ataupun pengujian di seluruh Balai Besar/ Balai/ Loka POM. Semakin banyak jenis Baku Pembanding dikembangkan di PPPOMN akan semakin banyak sampel obat yang

dapat diuji. Hasil pengembangan baku pembanding klobazam dapat digunakan untuk pengujian sampel obat klobazam baik secara kualitatif maupun kuantitatif.



Gambar 1. Struktur klobazam, 1,5-benzodiazepin.

2. Metodologi

2.1. Instrumen

Spektrofotometer FTIR dan UV-Vis yang digunakan adalah Shimadzu IR-Prestige 21 dan Shimadzu UV-1800 PC. Sistem kromatografi yang digunakan adalah kromatografi gas spektroskopi massa merk Agilent MS5977B dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) detektor DAD merk Shimadzu LC-20AD PDA Autosampler. Pengujian kemurnian secara *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) dilakukan menggunakan Shimadzu DSC 60A. Spektrum NMR diperoleh dengan menggunakan alat NMR 500 MHz merk JEOL, tipe JNM ECZR 500, berlokasi di Pusat Penelitian Kimia LIPI, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang, Banten.

2.2. Bahan

Bahan baku murni klobazam berasal dari PT. Otto Pharmaceuticals Industries Nomor Bets. 201809200248 yang telah dilakukan homogenisasi. Reagen yang digunakan yaitu kalium bromida dari Merck. 1.04907.0100, metanol *gradient grade* KC dari Merck. 1.06007.4000, asetonitril *gradient grade* KC dari Merck. 1.00030.4000, dan air mili-Q.

2.3. Prosedur

Pengujian klobazam dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Pada uji kualitatif klobazam dilakukan karakterisasi secara Spektrofotometri Inframerah, karakterisasi secara spektroskopi UV-Vis, karakterisasi secara kromatografi gas spektroskopi massa dan karakterisasi secara spektroskopi ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, dan HMBC. Pada uji Kuantitatif klobazam dilakukan uji kemurnian secara DSC dan kemurnian secara KCKT-DAD.

2.3.1. Karakterisasi secara Spektrofotometri Inframerah

Bahan baku klobazam ditimbang sebanyak 2 mg dan didispersikan dalam lebih kurang 200 mg kalium bromida. Selanjutnya dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer FTIR. Parameter yang ditentukan adalah bilangan gelombang (cm^{-1}) dari puncak-puncak yang muncul pada spektrum inframerah (Panitia Penyusun FI VI, 2020)

2.3.2. Karakterisasi secara Spektroskopi UV-Vis

Larutan uji klobazam disiapkan dengan melarutkan 1 mg bahan baku ke dalam 50,0 mL metanol, dipipet 1,0 mL dan diencerkan dengan metanol hingga 10,0 mL dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Parameter yang ditentukan adalah panjang gelombang (nm) dari spektrum ultraviolet.

2.3.3. Karakterisasi secara Kromatografi Gas Spektroskopi Massa

Karakterisasi klobazam diukur menggunakan kromatografi gas spektroskopi massa dengan kolom DB-5MS; 30 m x 0,25 mm i.d ; film thickness 0,25 μm . Suhu injektor 200°C dengan mode split (1:1000), volume penyuntikan 1,0 μL . Suhu MS Source 230°C, suhu MS Quad 150°C. Helium

digunakan sebagai gas pembawa dengan pemrograman suhu: meningkat dari 150°C (ditahan 5 menit) ke 300°C dengan laju 10°C/menit (ditahan 5 menit).

Larutan uji klobazam disiapkan dengan melarutkan lebih kurang 2 mg bahan baku ke dalam metanol hingga 2,0 mL. Parameter yang ditentukan adalah berupa kromatogram, berat molekul dan fragmentasi spesifik.

2.3.4. Kemurnian secara Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Klobazam ditimbang sebanyak lebih kurang 2 mg, dimasukkan ke dalam pan aluminium dan diukur menggunakan alat DSC dengan pemrograman suhu yaitu dengan start suhu 40°C dengan kenaikan suhu 10°C sampai suhu 200°C. Parameter yang ditentukan adalah titik leleh dan kemurnian.

2.3.5. Kemurnian secara KCKT-DAD

Kemurnian klobazam diukur menggunakan KCKT DAD dengan kolom L1; 150 x 4,6 mm i.d.; 5 µm. Kondisi KCKT: fase gerak asetonitril - akuades (40 : 60). Pelarut adalah fase gerak dengan volume penyuntikan 5 µL. Laju alir 1,0 mL/menit dan deteksi 230 nm (British Pharmacopoeia Commission Laboratory, 2016). Larutan uji disiapkan dengan melarutkan lebih kurang 3 mg bahan baku ke dalam fase gerak hingga 10,0 mL. Parameter yang ditentukan adalah waktu retensi, luas area dan *peak purity index*.

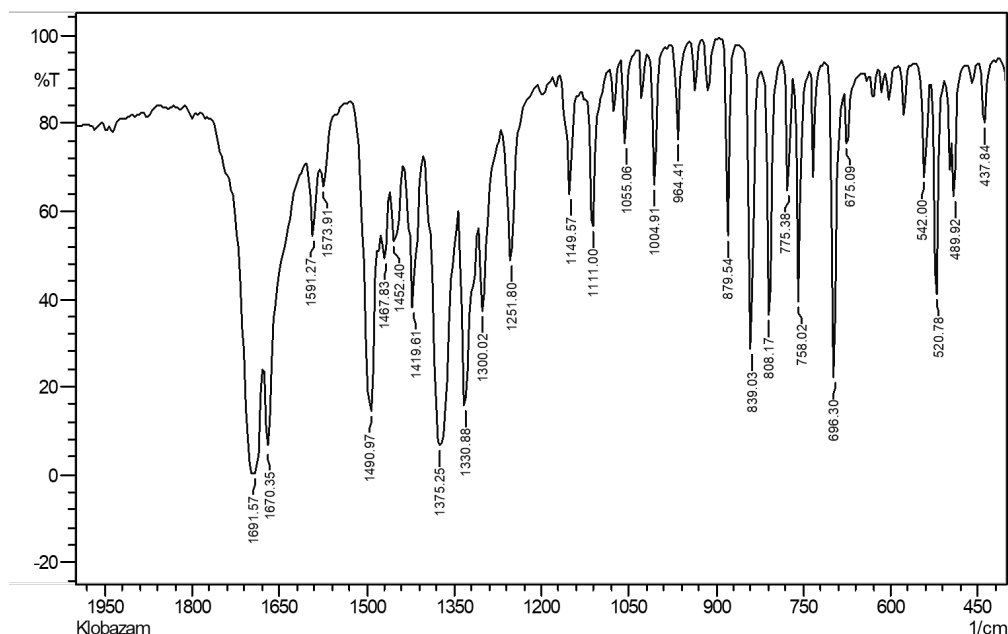
2.3.6. Karakterisasi secara Spektroskopi ¹HNMR, ¹³CNMR, HMQC, dan HMBC

Sejumlah lebih kurang 15 mg bahan baku dilarutkan dalam ± 0,7 mL deuterium CDCl₃, dimasukkan ke dalam tube NMR, diidentifikasi menggunakan eksperimen 1 dimensi (¹HNMR dan ¹³CNMR) dan 2 dimensi (HMQC dan HMBC). Frekuensi 500 MHz, suhu ruang pengukuran ~20°C.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Karakterisasi secara Spektrofotometri Inframerah

Berdasarkan analisis menggunakan spektroskopi inframerah menunjukkan bahwa gugus fungsi penyusun klobazam adalah C=C aromatik (1490,97 cm⁻¹), siklik keton C=O (1670,35 dan 1691,57 cm⁻¹), dan amina C-N (1330,88 dan 1375,25 cm⁻¹) (Bala, Khanna, & Pawar, Design Optimization and In vitro-In Vivo Evaluation of Orally Dissolving Strips of Clobazam, 2014) seperti tercantum pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektrum inframerah klobazam

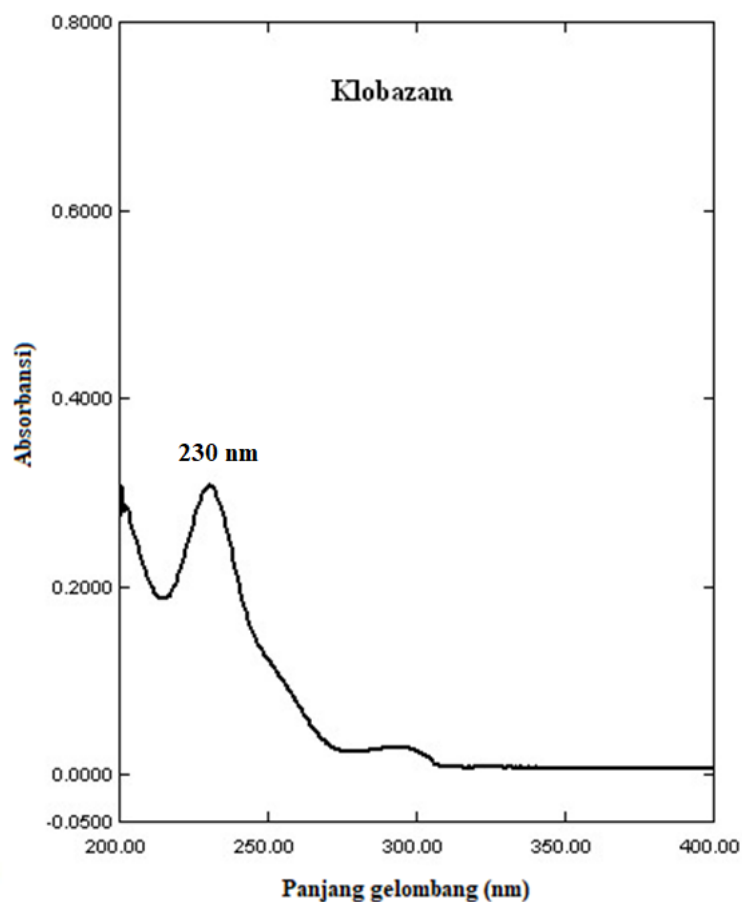
Tabel 1. Ikatan dan bilangan gelombang pada spektrum inframerah klobazam

<i>Bond</i>	Peaks cm^{-1} (Bala, <i>et al</i> , 2016)	Peaks cm^{-1} (Kumar, N., <i>et al</i> , 2017)	Peaks cm^{-1} (hasil penelitian)	Mode
C = O	1694,7	1693 1670	1691,57 1670,35	Stretch
C-C	1493,5		1490,97	Stretch
C-N	1100 - 1200		1111,00	Stretch
CH	600 - 800		696,30 – 775,38	Bending
CH ₃	1371		1375,25	Bending
CCl		758	758,02	Stretch
C = C		1591 1573	1591,27 1573,91	Stretch

Berdasarkan tabel diatas dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut adalah klobazam, hal ini sesuai dengan penelitian (Bala, Khanna, & Pawar, 2013) dan (Kumar, Devineni, Dubey, & Kumar, 2017).

3.2. Karakterisasi secara Spektroskopi UV-Vis

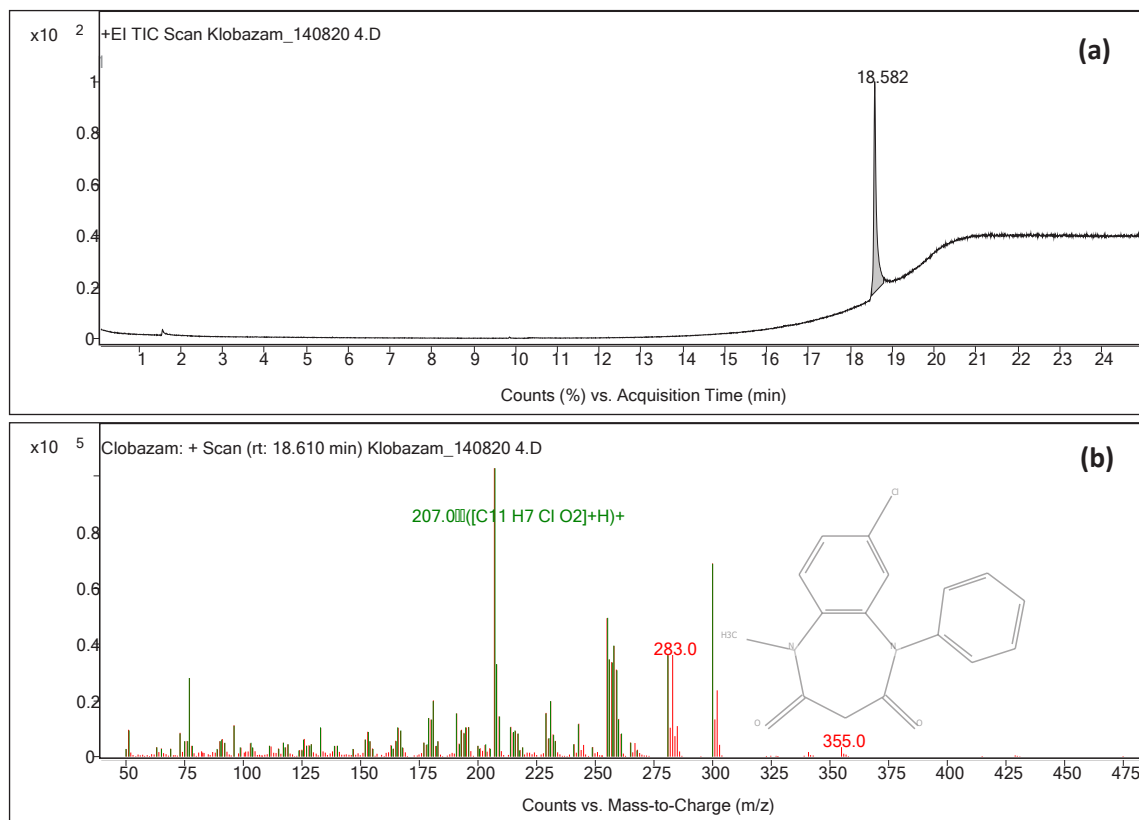
Analisis menggunakan spektroskopi UV-Vis menunjukkan spektrum ultraviolet klobazam (Gambar 3) pada panjang gelombang 230,5 nm. Profil spektrum ultraviolet klobazam sesuai dengan pustaka (Riahi, Bagherzadeh, Davarkhah, Ganjali, & Norouzi, 2011). Ini menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin aromatik, dimana terjadi eksitasi elektron dari π ke π^* (Pratiwi & Nandiyanto, 2022)



Gambar 3. Spektrum ultraviolet Klobazam

3.3. Karakterisasi secara Kromatografi Gas Spektroskopi Massa

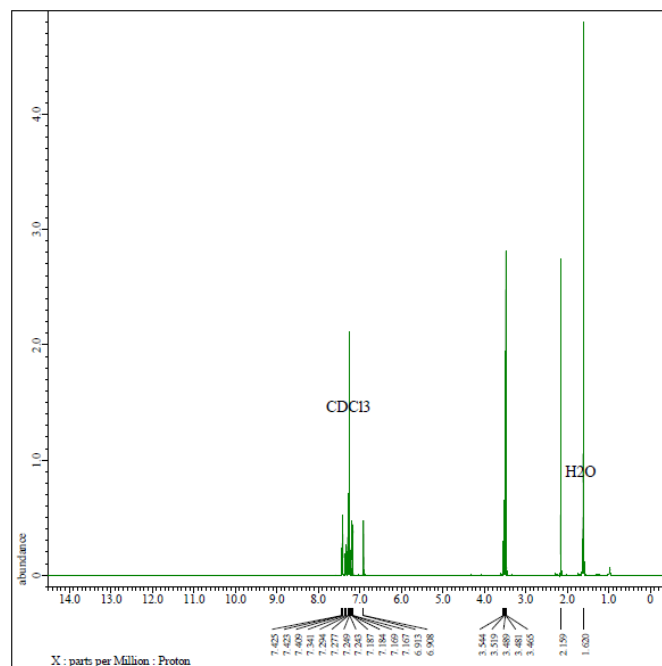
Spektrum massa pada kromatogram KGMS menunjukkan principal ions (m/z) klobazam adalah 207 ($C_{13}H_4N_2O_2$); 255,1 ($C_{15}H_{11}ClN_2$); 257,1 ($C_{14}H_9ClN_2O$); 258,1 ($C_{14}H_{10}ClN_2O$); dan 300 ($C_{15}H_7ClN_2O_2$) seperti terlihat pada Gambar 4 (The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2004).



Gambar 4. Kromatogram (a) dan spektrum massa (b) KGMS dari Klobazam

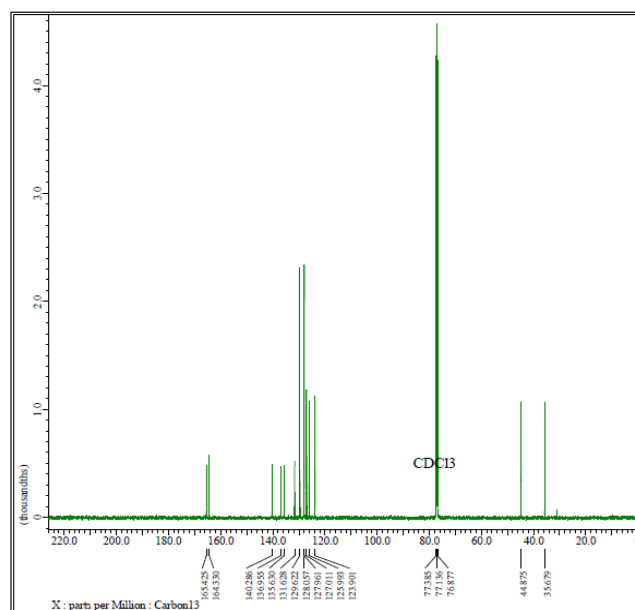
3.4. Karakterisasi secara Spektroskopi ¹HNMR, ¹³CNMR, HMQC, dan HMBC

Berdasarkan data ¹H-NMR sampel klobazam (500 MHz dalam CDCl₃) menunjukkan adanya 1 buah metil singlet yang *downfield* pada pergeseran kimia δ H 3,48 (3H, s, 1-NCH₃), 1 buah metilen yang terikat dengan gugus karbonil pada pergeseran kimia δ H 3,47 & 3,53 (2H, d, J 12,0 Hz, H-2), dan 8 buah CH aromatik pada pergeseran kimia δ H 6,91-7,42 ppm yang terdapat pada cincin A dan B. Pada cincin A, terdapat CH aromatik sistem ABX pada pergeseran kimia δ H 7,23 (1H, dd, J 2,29 & 8,59 Hz, H-8) yang berkorelasi meta dengan proton pada δ H 6,91 (1H, d, J 2,29 Hz, H-6) dan orto pada δ H 7,28 (1H, d, J 8,59 Hz, H-9). Pada cincin B, terdapat benzena mono substitusi pada pergeseran kimia δ H 7,42 (2H, dt, H-2' & H-6'), 7,17 (2H, dt, H-3' & H-5'), dan 7,34 (1H, dt, H-4') yang terlihat pada spektrum H-NMR (Gambar 5) yang sesuai dengan penelitian (Kumar, Devineni, Dubey, & Kumar, 2017). Selain itu, pada spektrum H-NMR juga terlihat masih adanya sisa pelarut aseton pada pergeseran kimia δ H 2,16 ppm yang menunjukkan klobazam belum murni 100%.



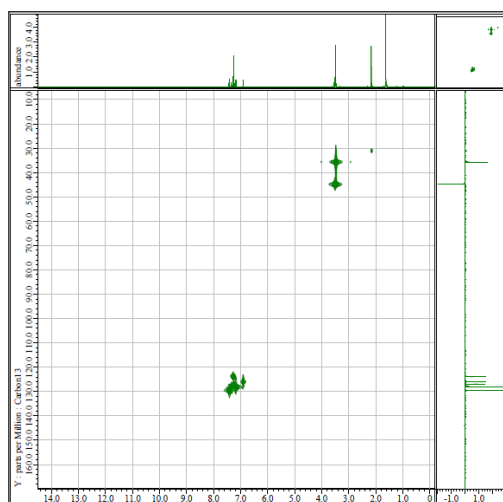
Gambar 5. Spektrum ^1H NMR Klobazam BPL (No. B0120439)

Data ^{13}C -NMR dan DEPT 135 (125 MHz dalam CDCl_3) memberikan gambaran bahwa sampel klobazam mengandung 16 atom karbon, terdiri dari 1 buah metil, 1 buah metilen, 8 buah metin, dan 6 buah karbon kuarternar. Gugus metil tersebut khas untuk N-CH_3 pada pergeseran kimia δC 35,7 ppm (1-NCH_3). Gugus metilen terdiri dari satu buah metilen yang terikat dengan gugus karbonil yang muncul pada pergeseran kimia δC 44,9 ppm. Gugus metin terdiri dari delapan buah CH -aromatik pada pergeseran kimia δC 125,9 (C-6); 127,0 (C-8); 123,9 (C-9), 129,6 (2C, C-2' & C-6'), 127,9 (2C, C-3' & C-6'), dan 128,1 (C-9). Enam buah karbon kuarternar terdapat pada pergeseran kimia δC 164,5 (C-2), 164,3 (C-4); 131,6 (C-5a); 135,6 (C-7); 136,9 (C-5) dan 140,3 (C-1') ppm yang sesuai dengan penelitian (Kumar, Devineni, Dubey, & Kumar, 2017).

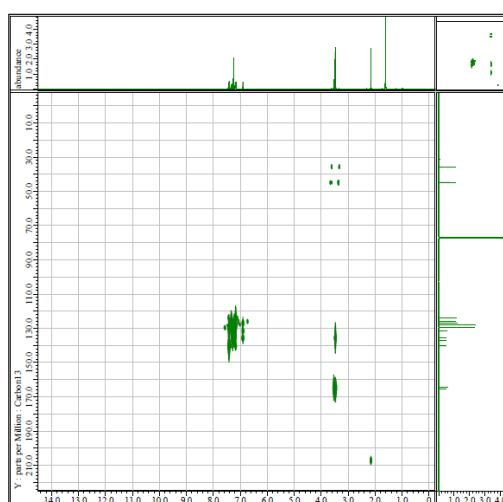


Gambar 6. Spektrum ^{13}C NMR Klobazam BPL (No. B0120439)

Hal tersebut diperkuat oleh data 2 Dimensi HMQC, HMBC dan H-H COSY pada Tabel 1 dan Gambar 3. Pada data HMQC, dapat diketahui inti proton yang berkorelasi langsung dengan karbon-13 (^{13}C) atau berkorelasi satu ikatan (1 JC,H) sehingga dapat diketahui dengan pasti pasangannya sendiri. Sinyal metil singlet pada δ_{H} 3,48 ppm (1-NCH₃) berkorelasi langsung dengan karbon pada 35,7 ppm (C-1). Sinyal metilen pada H-3 berkorelasi langsung dengan karbon pada δ_{C} 44,9 ppm (C-3). Selain itu, pada daerah aromatik juga terlihat masing-masing pada pergeseran kimia δ_{H} 6,91 ppm dengan δ_{C} 125,9 ppm; δ_{H} 7,23 ppm dengan δ_{C} 127,0 ppm; δ_{H} 7,28 ppm dengan δ_{C} 123,9 ppm; δ_{H} 7,42 ppm dengan δ_{C} 129,6 ppm; δ_{H} 7,17 ppm dengan δ_{C} 127,9 ppm; dan δ_{H} 7,41 ppm dengan δ_{C} 128,1 ppm. Dari spektrum HMBC dapat dilihat adanya korelasi proton dan karbon dengan jarak dua (2 J) sampai tiga ikatan (3 J) yang dapat dilihat pada Gambar 3. Dari data HMBC, pada daerah aromatik dapat dilihat adanya korelasi dari H-6 dengan C-8, C-5a, C-7; H-8 berkorelasi dengan C-7, C-6, C-5a; H-9 berkorelasi dengan C-5a, C-9a; H-2' dan H-6' berkorelasi dengan C-1' dan H-3'; H-5' berkorelasi dengan C-6, C-1' dan H-5' berkorelasi dengan C-3', C-5' yang sesuai dengan penelitian (Kumar, Devineni, Dubey, & Kumar, 2017) dapat dilihat pada Gambar 3.



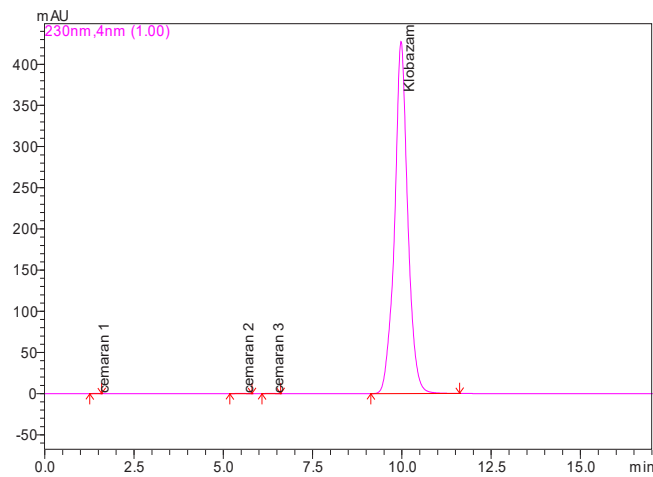
Gambar 4. Spektrum HMQC Klobazam



Gambar 5. Spektrum HMBC Klobazam

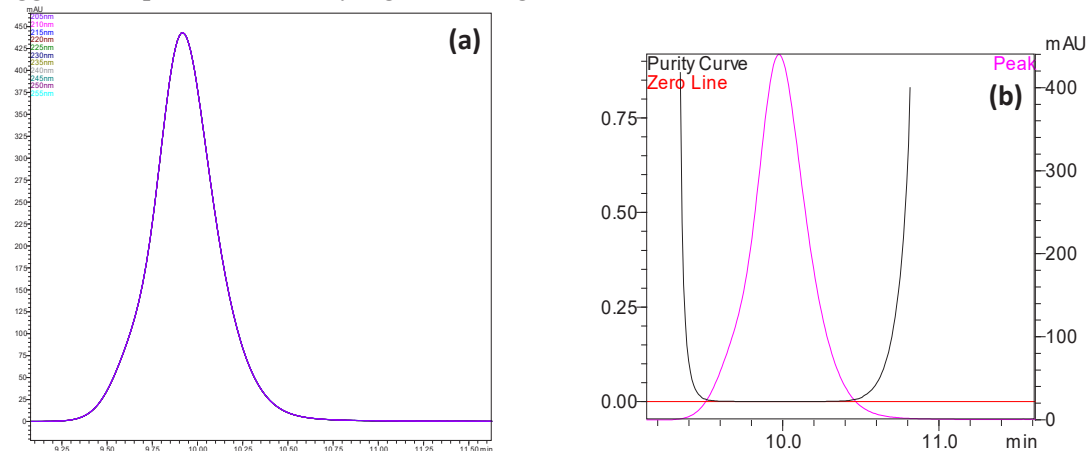
3.5. Kemurnian secara KCKT-DAD

Kemurnian klobazam diukur menggunakan KCKT-DAD dan diperoleh *purity index* sebesar 1,0000 dan kemurnian sebesar 99,73% ($n = 20$, $RSD = 0,01\%$), dan secara DSC diperoleh kemurnian sebesar 99,47% dan titik leleh sebesar $180,55^{\circ}\text{C}$. Hal ini menunjukkan klobazam adalah senyawa murni dan dapat digunakan sebagai baku pembanding.



Gambar 7. Kromatogram KCKT klobazam

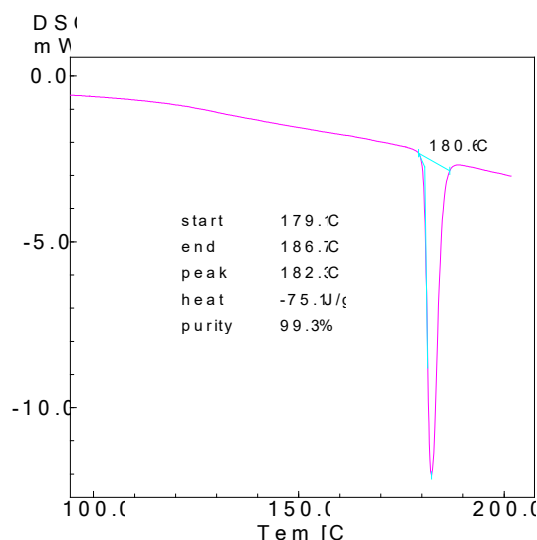
KCKT-DAD digunakan untuk mengetahui panjang gelombang optimal untuk analisis senyawa sehingga mendapatkan luas area yang besar dengan konsentrasi analit kecil.



Gambar 7. Kromatogram KCKT pada berbagai panjang gelombang (a) dan *peak purity index* (b) Klobazam

3.6. Kemurnian secara *Differential Scanning Calorimetry* (DSC)

Titik leleh digunakan untuk menentukan kemurnian suatu zat, jika senyawa tidak murni maka tidak akan terbentuk termograf yang lancip, yang akan terbentuk termograf yang melebar. Metode DSC ini merupakan metode independen yang digunakan untuk mengkonfirmasi nilai baku pembanding yang ditetapkan (Leontiev, Volovyk, Bevz, Vashchenko, & Gryzodub, 2018) Berdasarkan uji kemurnian secara DSC, klobazam meleleh pada suhu $180,55^{\circ}\text{C}$ dan kemurnian yang didapat sebesar 99,33%. Termograf hasil pengukuran dengan DSC terlihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Profil termogram klobazam

Kesimpulan

Klobazam hasil karakterisasi dan penetapan nilai kemurnian dapat menjadi Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI) dan digunakan dalam uji kualitatif dan kuantitatif. Klobazam memenuhi syarat karakterisasi dan kemurnian sebagai baku pembanding primer. Karakterisasi dilakukan secara spektroskopi inframerah, spektroskopi UV-Vis, kromatografi gas spektroskopi massa, dan spektroskopi ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, dan HMBC yang menunjukkan bahwa bahan baku adalah klobazam.

Kemurnian Klobazam diukur menggunakan KCKT-DAD dan diperoleh diperoleh *purity index* sebesar 1,0000 dan kemurnian sebesar 99,73% ($n=20$, $\text{SD}=0,01\%$, $\text{RSD}=0,01\%$), dan secara DSC diperoleh kemurnian sebesar 99,47% dan titik leleh sebesar 180,55 °C. Parameter validasi metode analisis secara KCKT berupa spesifisitas/selektifitas, uji kesesuaian sistem, linieritas dan rentang, akurasi, dan Presisi. Hasil validasi memenuhi syarat kriteria keberterimaan pada semua parameter validasi.

Daftar Referensi

- Badan Pengawas Obat dan Makanan. (2021). Pedoman Pengembangan Baku Pembanding. 2021, pp. 1-14.
- Bala, R., Khanna, S., & Pawar, P. (2014). Design Optimization and In vitro-In Vivo Evaluation of Orally Dissolving Strips of Clobazam. *Journal of Drug Delivery*, 2014, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2014/392783>
- Bala, R., Khanna, S., & Pawar, P. K. (2013). Formulation and optimization of fast dissolving intraoral drug delivery system for clobazam using response surface methodology. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(3), 151-159.
- British Pharmacopoeia Commission Laboratory. (2016). *British Pharmacopoeia*. London: Medicine and Healthcare products Regulatory Agency.
- Culbert, P. A., & Johnson, B. D. (2004). *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals* (Vol. 5). Connecticut, USA: Pfizer Global Research and Development.
- Gauthier, A. C., & Mattson, R. H. (2015). Clobazam: a safe, efficacious, and newly rediscovered therapeutic for epilepsy. *CNS Neurosci Therapeutics*, 21(7), 543-548.
- Kumar, N., Devineni, S. R., Dubey, S. K., & Kumar, P. (2017). Potential impurities of anxiolytic drug, clobazam: Identification, synthesis and characterization using HPLC, LC-ESI/MSn and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1-41.

- Leontiev, D. A., Volovyk, N. V., Bevz, O. V., Vashchenko, O. V., & Gryzodub, O. I. (2018). Characterization of a reference standard for qualification of differential scanning calorimetry intended for purity determination in certification of pharmaceutical reference standards. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(11), 2709-2714.
- Panitia Penyusun FI VI. (2020). *Farmakope Indonesia Edisi VI*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Pratiwi, R. A., & Nandiyanto, A. B. (2022). How to Read and Interpret UV-VIS Spectrophotometric Results in Determining the Structure of Chemical Compounds. *Indonesian Journal of Educational Research and Technology*, 2(1), 1-20.
- Riahi, S., Bagherzadeh, K., Davarkhah, N., Ganjali, M. R., & Norouzi, P. (2011). Spectrophotometric and Chemometric Studies on the Simultaneous Determination of Two Benzodiazepines in Human Plasma. *Materials Science and Engineering C*, 31(5), 992-996.
- The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. (2004). *Clarckes Analysis of Drugs and Poisons*. London: the Pharmaceutical Press.
- Tolbert, D., & Larsen, F. (2018). A Comprehensive Overview of the Clinical Pharmacokinetics of Clobazam. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 00(0), 1-13.