

Research Article

Optimasi dan Validasi Metode KCKT untuk Identifikasi dan Penetapan Kadar Vitamin B1, B3, B6, dan Kofein dalam Suplemen Kesehatan

Sabaruddin¹, Umy Kurniati Rasyid¹, Whyllies Agung Ajie Buana¹, Meike Pakaya¹ dan Fitriana Nur Husain^{1*}

¹ BPOM Gorontalo, Jl. Tengah Toto Selatan Kabila Bone Bolango Gorontalo, Indonesia

ABSTRAK

INFO ARTIKEL

Dikirim : 23 Jun. 2022

Direvisi : 15 Agt. 2022

Diterima : 18 Agt. 2022

*Corresponding Author:

Fitriana Nur Husain,
Balai POM di Gorontalo,
Indonesia,
Telp: +62-852-5574-9580
Email:
fitriana.nur@pom.go.id

Abstrak: Uji identifikasi dan penetapan kadar merupakan salah satu persyaratan mutu suplemen kesehatan yang mengandung vitamin B1, B3, B6, dan kofein sehingga diperlukan metode analisis yang optimal untuk mendeteksi secara simultan analit-analit tersebut dalam suatu campuran matriks. Saat ini telah tersedia metode analisa KCKT sistem gradien untuk pengujian tersebut. Namun, dari metode analisa tersebut diperoleh profil kromatogram yang belum optimal dengan nilai resolusi 0,844 pada puncak analit vitamin B3 dan B1. Hal ini disebabkan masih berhimpitnya puncak kedua analit dan tidak terpisah dengan baik pada baseline kromatogram. Oleh karena itu dianggap perlu untuk melakukan optimasi pada metode analisa ini dengan melakukan modifikasi perbandingan komposisi fase gerak sistem gradien pada menit terelusnya vitamin B3 dan B1. Metodologi penelitian menggunakan penelitian eksperimental laboratorium dengan parameter yang diamati adalah profil kromatogram pemisahan puncak analit dan nilai resolusi antara vitamin B3 dan B1. Berdasarkan data hasil optimasi diperoleh komposisi fase gerak ammonium asetat : asetonitril (25:75) yang memberikan profil kromatogram optimal terhadap pemisahan vitamin B3 dan B1 dengan nilai resolusi 7,230 untuk vitamin B3 dan 3,427 untuk vitamin B1 (syarat resolusi > 2). Metode optimasi kemudian dilanjutkan dengan validasi metode analisa dengan hasil uji parameter selektifitas, akurasi, presisi, linearitas, nilai LOD, dan nilai LOQ memenuhi syarat keberterimaan sehingga metode ini dapat digunakan untuk melakukan pengujian identifikasi dan penetapan kadar vitamin B1, B3, B6, dan kofein dalam sediaan suplemen kesehatan.

Kata kunci: Kromatografi Cair Kinerja Tinggi; validasi metode analisa; produk suplemen

PENDAHULUAN

Suplemen Kesehatan adalah produk yang dimaksudkan untuk melengkapi kebutuhan zat gizi, memelihara, meningkatkan dan/atau memperbaiki fungsi kesehatan, mempunyai nilai gizi dan/atau efek fisiologis, mengandung satu atau lebih bahan berupa vitamin, mineral, asam amino dan/atau bahan lain bukan tumbuhan yang dapat dikombinasi dengan tumbuhan. Persyaratan mutu Suplemen Kesehatan harus sesuai dengan ketentuan Farmakope Indonesia dan/atau Farmakope Herbal Indonesia, salah satunya adalah parameter uji penetapan kadar bahan aktif. Produk suplemen kesehatan mengandung kombinasi multivitamin dilakukan penetapan kadar dengan prioritas pada vitamin yang mempunyai laju degradasi paling cepat yaitu vitamin A atau vitamin K (mewakili vitamin larut lemak) dan/atau vitamin C atau Piridoksin (mewakili vitamin larut air) (PerBPOM 2019).

Thiamin (B1), Nikotinamid (B3), dan Piridoksin (B6) adalah kelompok vitamin larut air. Thiamin dapat mengalami perubahan struktur dalam kondisi lingkungan asam dan basa. Pada kondisi asam ($\text{pH} \leq 6$), thiamin terhidrolisis menjadi 2-methyl-4-amino-5 beta hidroksimetil pirimidin dan 4-methyl-5-hidroksietil thiazole. Kondisi larutan asam kuat, thiamin terdegradasi menjadi oxythiamin melalui pelepasan gugus amino primer dari cincin pirimidin, yang digantikan oleh gugus hidroksil. Sedangkan pada kondisi basa, thiamin dikonversi menjadi pseudobasa yang netral, kemudian dikonversi menjadi bentuk thiol, menjadi komponen-komponen yang mengandung sulfur dengan berat molekul yang rendah. Reaksi konversi thiamin dapat terjadi pada pemanasan dan penyimpanan produk. Vitamin B3 atau niasin secara umum terdiri atas dua jenis yaitu asam nikotinat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$) dan nikotinamid ($\text{C}_6\text{H}_6\text{ON}_2$). Niasin merupakan vitamin yang sangat stabil terhadap panas, cahaya dan oksigen, sehingga selama pengolahan dan penyimpanan keberadaan niasin dapat dipertahankan. Vitamin B6 terdapat dalam tiga bentuk yaitu piridoksin, piridoksal, dan piridoksamin. Bentuk yang paling banyak diproduksi secara komersial adalah piridoksin HCl. Vitamin B6 ada yang bermuatan positif, negatif dan netral, tergantung pada pH larutan. Pada lingkungan asam, berada dalam bentuk kation atau bermuatan positif (bertambahnya jumlah proton yang diberikan oleh asam). Lingkungan netral, tidak bermuatan atau tidak terionisasi. Sedangkan lingkungan basa, berada dalam bentuk anion atau negative (karena hidrogen dari gugus hidroksil terdisosiasi dan atom hidrogennya lepas). Piridoksin stabil terhadap panas namun kurang stabil pada kondisi lingkungan asam dan basa terutama jika dikombinasikan dengan proses pemanasan. Piridoksin

yang paling tahan terhadap pengaruh pengolahan dan penyimpanan (Ina 2015).

Penelitian yang telah dilakukan yaitu perbandingan metode analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) eluasi gradien dengan isokratik pada penentuan vitamin B1, B2, dan B6 pada sediaan sirup multivitamin secara simultan (Ariani 2015). Dari penelitian tersebut, diperoleh bahwa metode KCKT gradien hasil pengembangan dari metode isokratik memberikan hasil analisis yang lebih optimal dilihat dari parameter waktu retensi, daya pisah, dan uji presisi (Ariani 2015). Saat ini telah tersedia juga metode analisa untuk identifikasi dan penetapan kadar vitamin B1, B3, B6, dan kofein dalam suplemen kesehatan secara KCKT detektor Photo Diode Array menggunakan sistem gradien (PPPOMN 2017). Namun terdapat kendala pada metode ini yakni puncak analit vitamin B3 dan B1 tidak terpisah dengan baik sehingga tidak dapat ditentukan baseline masing-masing puncak analit. Hal ini juga mempengaruhi nilai resolusi yang rendah antara analit vitamin B3 dan B1. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi komposisi fase gerak sistem gradien sehingga puncak analit vitamin B3 dan B1 dapat terpisah dengan baik pada baseline masing-masing serta menghasilkan nilai resolusi yang tinggi. Pemisahan yang baik dapat memudahkan dalam perhitungan penetapan kadar masing-masing analit dan akan berpengaruh terhadap pengambilan kesimpulan sesuai persyaratan mutu sediaan suplemen kesehatan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang profil kromatogram vitamin B1, B3, B6, dan kofein yang telah dioptimasi kondisi pemisahannya serta dapat dimanfaatkan selanjutnya untuk melakukan pengujian mutu suplemen kesehatan yang beredar di masyarakat.

MATERIAL DAN METODE

Material

Alat

KCKT Shimadzu SPD-20A dengan Software LC Solution dilengkapi detektor PDA (SPD-M20A), kolom KCKT C18 dimensi 4,6 mm x 250 mm x 5 µm, pH meter Mettler Toledo Seven Multi, timbangan analitik Precisa XB 220A, timbangan mikro Mettler Toledo XP6, Waterbath Shaker Memmert SV 1422, penyaring fase gerak Millipore WP6122050.

Bahan

Baku pembanding Tiamin HCl BPFI (Badan POM B0318063), Nikotinamid BPFI (Badan POM B0316228), Piridoksin HCl BPFI (Badan

POM B0117537), Kofein BPFI (Badan POM 413017), Asam Folat BPFI (Badan POM B0314004), Riboflavin BPFI (Badan POM 413029), asam asetat glasial pro analisa (Merck), ammonium asetat pro analisa (Merck), natrium hidroksida pro analisa (Merck), asam ortofosfat pro analisa (Merck), asetonitril HPLC grade (Merck), dan aquabidestillata yang diproduksi di laboratorium menggunakan Millipore

Metode

Metodologi penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium di laboratorium Badan POM Gorontalo dengan parameter yang diamati adalah profil kromatogram pemisahan puncak analit dan nilai resolusi antara vitamin B3 dan B1 melalui optimasi variabel perubahan komposisi fase gerak pada menit elusi vitamin B3 dan B1. Sampel diperoleh dari sampling secara purposif terhadap tablet multivitamin suplemen kesehatan dengan kandungan vitamin B1, B3, B6, dan kofein yang beredar di provinsi Gorontalo. Selanjutnya dilakukan pengujian optimasi, uji kesesuaian sistem, dan validasi metode analisa di laboratorium menggunakan prosedur metode analisa sebagai berikut:

Pembuatan Pereaksi

- Pelarut asam asetat 1%
- Pelarut natrium hidroksida 1 N
- Larutan Ammonium asetat 25 mM : Ditimbang seksama 1,925 gram ammonium asetat, dilarutkan dengan air hingga 1000,0 mL kemudian pH diatur hingga 5,0 dengan penambahan asam ortofosfat 85%.

Penyiapan Larutan Baku Induk

Baku Vitamin B1, B3, B6, dan Kofein ditimbang saksama lebih kurang 25 mg, dimasukkan masing-masing ke dalam labu tentukur 5 mL, ditambahkan 1 mL larutan asam asetat 1%, diencerkan dengan air sampai tanda. Dipipet 50 μ L dalam labu tentukur 5 mL, diencerkan dengan air sampai tanda (larutan baku tunggal).

Larutan Baku Campuran

Masing-masing larutan baku induk dipipet 1 mL ke dalam labu 10 mL, diencerkan dengan air sampai tanda. Dibuat larutan seri sebagai berikut (Larutan A):

- Seri 1 = 200 μ L
- Seri 2 = 400 μ L
- Seri 3 = 800 μ L
- Seri 4 = 1200 μ L

- Seri 5 = 1600 uL
- Seri 6 = 2000 uL

Dimasukkan dalam labu 10 mL diencerkan dengan air sampai tanda.

Larutan Matriks

Sejumlah 10 tablet dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL, ditambahkan 5 mL air, tambahkan 1 mL larutan NaOH 1 N, dimasukkan ke dalam shaker selama 5 menit, ditambahkan 5 mL larutan asam asetat 1%, dimasukkan ke dalam shaker selama 10 menit, ditambahkan dengan air hingga tanda, sebelum dicukupkan pastikan pH dari larutan sampel adalah 5, apabila larutan sampel lebih dari 5 diasamkan dengan asam asetat 1%. Larutan sampel tersebut disaring dengan penyaring membran. Dipipet 500 μ L filtrat, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, diencerkan dengan air sampai tanda, dibuat duplo (Larutan B).

Larutan Spiked Sample

Dengan cara yang sama seperti larutan uji ditambahkan baku B1, B3, B6, dan Kofein sebanyak kurang lebih 25 mg, dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL, ditambahkan 5 mL air, 1 mL NaOH 1 N, dimasukkan ke dalam shaker selama 5 menit, ditambahkan 5 mL larutan asam asetat 1%, dimasukkan ke dalam shaker selama 10 menit, ditambahkan dengan air hingga tanda, sebelum dicukupkan pastikan pH dari larutan sampel adalah 5, apabila larutan sampel lebih dari 5 diasamkan dengan larutan asam asetat 1%. Larutan sampel tersebut disaring dengan penyaring membran, Pipet 500 μ L filtrat, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, diencerkan dengan air sampai tanda, kemudian dibuat larutan seri, sebagai berikut (Larutan C):

- Seri Spiked 1 = 200 uL
- Seri Spiked 2 = 400 uL
- Seri Spiked 3 = 800 uL
- Seri Spiked 4 = 1200 uL
- Seri Spiked 5 = 1600 uL
- Seri Spiked 6 = 2000 uL

Dimasukkan dalam labu 10 mL diencerkan dengan air sampai tanda.

Cara Penetapan

Larutan A, B dan C masing-masing disuntikkan secara berurutan dengan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kondisi sebagai berikut :
Fase diam : Kolom C18 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril dan Amonium asetat 25 mM pH 5,0 dengan sistem gradien pada tabel sebagai berikut:

Tabel 1. Sistem gradien sesuai metode Analisa

Waktu	Ammonium Asetat	Asetonitril
0,00	0	100
6,00	0	100
25,00	50	50
25,50	100	0
34,99	100	0
40,00	Stop	

Volume penyuntikkan : 20 µL

Detektor : PDA pada panjang gelombang 200-400 nm, B1, Nikotinamida, B6 dan Kofein diamati pada panjang gelombang 254 nm

Laju alir kolom : 1,0 mL / menit

Kondisi Optimasi

Optimasi dilakukan pada menit ke 25,00 dengan melakukan perubahan komposisi fase gerak hingga diperoleh profil kromatogram yang terpisah dengan baik antara puncak analit vitamin B3 dan B1. Kondisi optimasi ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 2. Kondisi optimasi pertama (45:55)

Waktu	Ammonium Asetat	Asetonitril
0,00	0	100
6,00	0	100
25,00	45	55
25,50	100	0
34,99	100	0
40,00	Stop	

Tabel 3. Kondisi optimasi kedua (25:75)

Waktu	Ammonium Asetat	Asetonitril
0,00	0	100
6,00	0	100
25,00	25	75
25,50	100	0
34,99	100	0
40,00	Stop	

Penetapan Selektifitas

Larutan baku tunggal Vitamin B1, Nikotinamid, B6, dan Kofein, larutan B dan larutan C (seri *spiked* 3) masing-masing disuntikkan secara

berurutan dengan kondisi kromatografi cair kinerja tinggi pada optimasi kedua.

Hasil uji dinyatakan negatif jika waktu retensi, profil spektrum dan panjang gelombang serapan maksimum dari larutan uji tidak sama dengan larutan baku dan larutan *spiked sample*.

Penetapan Presisi dan Akurasi

Digunakan larutan baku induk, larutan baku campuran, dan larutan *spiked sample* seperti pada pengujian Selektifitas. Untuk penentuan nilai akurasi dan presisi, dibuat 3 replikasi untuk masing-masing seri *spiked*. Pengukuran terhadap larutan berikut:

- Seri *spiked* 1 A, B, C
- Seri *spiked* 4 A, B, C
- Seri *spiked* 6 A, B, C

Disuntikkan secara berurutan larutan baku seri 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 serta seri *spiked* 1, 4 dan 6 dengan kondisi analisis seperti pada cara penetapan pada uji Selektifitas.

Penetapan Linearitas

Digunakan larutan baku induk, larutan baku campuran, dan larutan *spiked sample* seperti pada pengujian Selektifitas. Untuk penentuan nilai linearitas, dibuat 2 replikasi untuk masing-masing seri *spiked*. Pengukuran terhadap larutan berikut:

- Seri *spiked* 1 A, B
- Seri *spiked* 2 A, B
- Seri *spiked* 3 A, B
- Seri *spiked* 4 A, B
- Seri *spiked* 5 A, B
- Seri *spiked* 6 A, B

Disuntikkan secara berurutan larutan seri *spiked* 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 dengan kondisi analisis seperti pada cara penetapan pada uji Selektifitas.

Penetapan Batas Deteksi dan Kuantitasi (LOD & LOQ)

Dilakukan pengujian seperti pada prosedur akurasi, dibuat kurva kalibrasi (konsentrasi sebagai absis dan area sebagai ordinat), dan dihitung nilai $S_{y/x}$ dan S_A , menggunakan rumus:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-2}} \quad S_A = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum (x_i)^2}{n \times \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

yi : respon hasil pengukuran

yc: respon hasil perhitungan dari persamaan regresi

Kemudian dihitung nilai LOD dan LOQ menggunakan rumus:

$$LOD = \frac{3 \times S_A}{b} \quad \text{Nilai LOD metode } (\mu\text{g/g}) = \frac{LOD \times F_p}{B}$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_A}{b} \quad \text{Nilai LOQ metode } (\mu\text{g/g}) = \frac{LOQ \times F_p}{B}$$

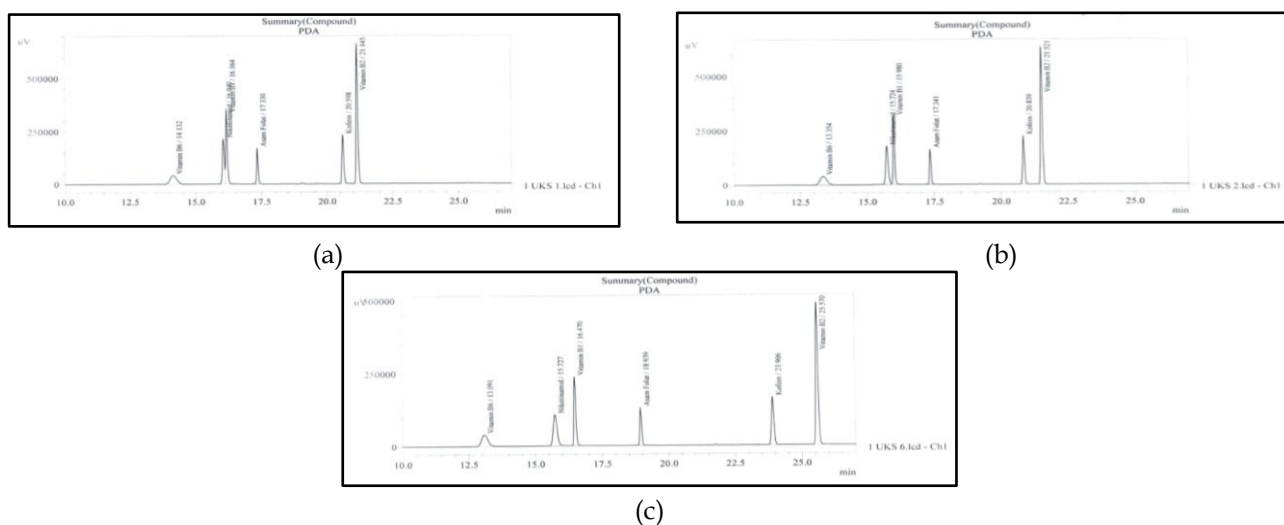
Dimana S_A adalah simpangan baku dari y-intersep, b adalah slope, F_p adalah faktor pengenceran, dan B adalah bobot sampel.

Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan software Microsoft Excel 2010.

HASIL

Hasil pengujian memperlihatkan profil kromatogram yang berbeda antara metode analisa awal dan metode optimasi, terutama pada profil puncak analit vitamin B1 dan B3 yang ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar 1. Profil kromatogram: (a) Metode awal; (b) Metode optimasi pertama (45:55); (c) Metode optimasi kedua (25:75)

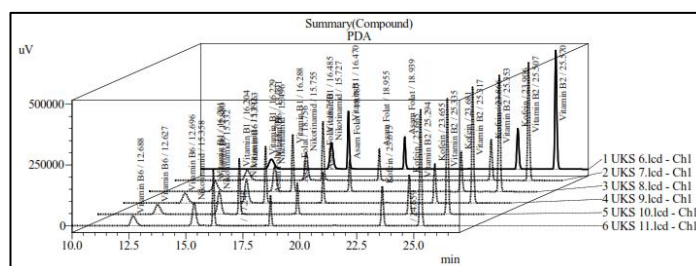
Pada gambar 1 menggunakan perbandingan amonium asetat dan asetonitril (50:50) sesuai dengan metode asli menunjukkan puncak vitamin B1 dan B3 yang berhimpit dan tidak terpisah dengan baik sehingga menghasilkan nilai resolusi yang rendah dan penentuan nilai area puncak yang tidak berada pada baseline kromatogram. Puncak analit vitamin B3 belum terelusi sempurna, sebagian lembah analit masih tertahan di dalam fase diam dan puncak analit vitamin B1 sudah mulai terelusi pada waktu

yang bersamaan. Hal ini menyebabkan bias pada perhitungan nilai area dan penarikan kesimpulan hasil uji identifikasi. Oleh karena itu, dilakukan optimasi dengan modifikasi komposisi amonium asetat dan asetonitril pada sistem gradien metode tersebut. Hasil optimasi kedua dengan perbandingan komposisi fase gerak ammonium asetat dan asetonitril (25:75) menunjukkan profil kromatogram dengan pemisahan optimal sehingga komposisi optimasi kedua ini yang akan dilanjutkan dengan validasi metode analisis. Perbandingan parameter kromatogram pada suntikan campuran baku pembanding dapat dilihat pada tabel di bawah:

Tabel 4. Perbandingan hasil optimasi

Metode	Awal		Optimasi I		Optimasi II	
Komposisi Amonium Asetat : Asetonitril	50:50		45:55		25:75	
Parameter	Vit B3	Vit B1	Vit B3	Vit B1	Vit B3	Vit B1
Waktu retensi	16,040	16,164	15,724	15,980	15,727	16,470
Area	1180932	1505190	1189096	1403861	1110462	1258235
Faktor ikutan	0	0	1,225	1,369	1,171	1,340
Lempeng teoritis	142078	269207	107982	247902	50628	183554
Resolusi	5,871	0,844	7,105	1,605	7,230	3,427

Sebelum melakukan validasi metode, terlebih dahulu dilakukan uji kesesuaian sistem kromatografi yakni dengan menyuntikkan satu konsentrasi larutan baku ke dalam sistem KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Hasil uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada profil kromatogram (Gambar 2) dan tabel nilai parameter hasil uji kesesuaian sistem (Tabel 5) di bawah:



Gambar 2. Profil kromatogram uji kesesuaian sistem metode optimasi kedua (25:75)

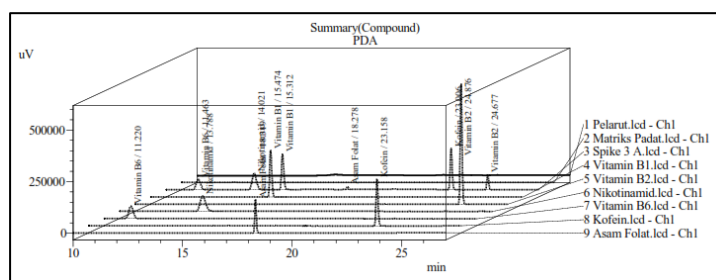
Tabel 5. Rata-rata nilai parameter uji kesesuaian sistem metode optimasi kedua (25:75)

Baku	Waktu retensi	Area	%RSD Area	Faktor ikutan	Lempeng teoritis	Resolusi
Vitamin B6	12,857	663859	1,572	1,164	13648	13,287
Vitamin B3	15,510	1090369	1,992	1,157	45146	7,231
Vitamin B1	16,313	1236844	1,585	1,331	179126	3,582
Asam Folat	18,816	657041	0,806	1,252	242763	15,248
Kofein	23,731	1066617	1,674	1,167	253473	28,802
Vitamin B2	25,396	2891844	1,656	1,197	333122	8,180
Syarat			< 2,0	< 2,0	> 10000	> 2,0

Dari data hasil uji kesesuaian sistem dibandingkan dengan syarat keberterimaan parameter uji kesesuaian sistem yakni pada %RSD area, faktor ikutan, lempeng teoritis dan resolusi dari lima kali penyuntikan enam baku pembanding dalam larutan baku campuran tersebut sudah memenuhi syarat sesuai Farmakope Indonesia Edisi VI tahun 2020.

Hasil Uji Selektivitas

Hasil uji selektifitas dapat dilihat pada profil kromatogram gambar 3 berikut ini:



Gambar 3. Profil kromatogram uji selektifitas

Uji selektifitas dilakukan untuk mengetahui apakah suatu metode dapat memisahkan analit dari senyawa pengotor, matriks, atau degradan.

Hasil Uji Presisi dan Akurasi

Data hasil uji akurasi dari enam senyawa yang diukur menggunakan larutan spiked sample dengan syarat keberterimaan mengikut pada Burges (untuk presisi) dan AOAC International (untuk akurasi dan linearitas) dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 6. Hasil uji presisi dan akurasi

Baku	Spiked	Horrat (%)	Syarat Horrat	Rekoveri (%)	Syarat (%)
Vit B6	1	1,18	≤ 7,3	96-105	80-110
	4	0,49	≤ 5,3	97-100	90-107
	6	1,18	≤ 3,7	97-103	95-105
Vit B3	1	1,16	≤ 7,3	90-98	80-110
	4	0,48	≤ 5,3	96-99	90-107
	6	1,15	≤ 3,7	96-102	95-105
Vit B1	1	1,12	≤ 7,3	95-103	80-110
	4	0,93	≤ 5,3	98-104	90-107
	6	1,08	≤ 3,7	100-105	95-105
Kofein	1	1,04	≤ 7,3	94-102	80-110
	4	0,55	≤ 5,3	100-101	90-107
	6	0,84	≤ 3,7	100-105	95-105

Hasil Uji Linearitas

Data hasil uji linearitas berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 7. Hasil uji linearitas

Baku	Nilai r	Syarat r
Vitamin B6	0,9999	$\geq 0,999$
Vitamin B3	0,9999	$\geq 0,999$
Vitamin B1	0,9999	$\geq 0,999$
Kofein	0,9999	$\geq 0,999$

Hasil Uji Batas Deteksi dan Kuantitasi (LOD & LOQ)

Hasil perhitungan nilai LOD dan LOQ dari enam analit yang diuji ditunjukkan pada tabel di bawah ini:

Tabel 8. Hasil perhitungan nilai LOD dan LOQ

Baku	Nilai LOD ($\mu\text{g/g}$)	Nilai LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Vitamin B6	10,37	8,18
Vitamin B3	10,56	8,33
Vitamin B1	11,16	8,80
Kofein	9,07	7,16

PEMBAHASAN

Hasil optimasi metode menunjukkan bahwa semakin rendah komposisi fase organik dari fase gerak maka dapat meningkatkan nilai *Relative Retention Time* (RRT) pemisahan analit, menghasilkan bentuk puncak analit simteris dan mendekati kriteria keberterimaan (Chrissanti 2020). Peningkatan waktu retensi menyebabkan komponen analit keluar dari kolom tidak bersamaan dan secara langsung akan meningkatkan resolusi dari puncak yang dihasilkan (Kurnia 2019).

Uji kesesuaian sistem pada penelitian ini menggunakan larutan baku campuran (Larutan A) sebanyak 6 kali penyuntikan berulang pada kondisi optimasi II. Parameter yang diuji antara lain keterulangan waktu retensi, area puncak (dinyatakan dengan %RSD), faktor ikutan, angka lempeng teoritis, dan resolusi (Ayuningtyas 2021). Dari data hasil uji kesesuaian sistem dibandingkan dengan syarat keberterimaan parameter uji kesesuaian sistem yakni pada %RSD area, faktor ikutan, lempeng teoritis dan resolusi dari lima kali penyuntikan enam baku pembanding dalam larutan baku campuran tersebut sudah memenuhi syarat sesuai Farmakope Indonesia Edisi VI tahun 2020. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa sistem telah stabil, kondisi operasional untuk melakukan analisis dengan KCKT sudah membentuk suatu kesatuan sistem yang dapat memberikan

hasil uji dengan baik, sehingga dapat dilanjutkan untuk mengerjakan parameter uji validasi (Aziz 2020).

Uji selektifitas dilakukan untuk mengetahui apakah suatu metode dapat memisahkan analit dari senyawa pengotor, matriks, atau degradan. Puncak kromatogram analit tidak boleh diganggu oleh puncak-puncak komponen lain, dan memberikan pemisahan yang baik antara analit dengan komponen lain (matriks, pengotor, degradan) (Ayuningtyas 2021). Persyaratan suatu metode dapat disebut selektif adalah resolusi lebih besar dari 2,0 (Farmakope Indonesia 2020). Hasil uji selektifitas diperoleh tidak ada puncak pada pelarut dan larutan matriks yang memiliki waktu retensi yang sama dengan waktu retensi larutan baku. Selain itu, larutan baku dan larutan spiked sample memberikan puncak dengan waktu retensi yang sama. Hal ini juga ditunjukkan dengan nilai resolusi dari enam baku pada larutan spiked sample tersebut adalah vitamin B6 (14,203), vitamin B3 (6,528), vitamin B1 (4,279), asam folat (16,241), kofein (28,068), dan vitamin B2 (9,153) menunjukkan metode selektif memisahkan enam baku yang digunakan.

Uji akurasi dilakukan untuk mengetahui akurasi dari metode analisis dengan menghitung persen perolehan kembali larutan baku yang ditambahkan ke dalam sampel. Uji akurasi dilakukan dengan standard addition method (Aziz 2020). Akurasi dinyatakan sebagai persen rekovery dari hasil analisis uji terhadap kadar analit sebenarnya yang ditambahkan dalam masing-masing sampel. Larutan uji akurasi disipakna dalam tiga konsentrasi dengan replikasi sebanyak tiga kali untuk setiap konsentrasi, kemudian dihitung persen rekoverynya (Ayuningtyas 2021).

Uji presisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah repeatability, yaitu analisis dengan replikasi tiga kali secara independen dari tiga konsentrasi sampel seperti pada uji akurasi. Kriteria penerimaan presisi adalah dengan menghitung nilai relative standard deviation (RSD) yang dinyatakan dalam nilai RSD Horrat (Ayuningtyas 2021). Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa enam baku tersebut memenuhi syarat keberterimaan presisi. Begitu pula dengan rentang persen perolehan kembali pada parameter akurasi memenuhi syarat keberterimaan. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antara bobot baku pembanding yang ditambahkan dan bobot baku pembanding yang diperoleh kembali (Aziz 2020).

Uji linearitas dilakukan dengan membuat kurva baku antara area puncak dengan konsentrasi baku, kemudian dihitung harga koefisien korelasi (r) dan persamaan $y=a+bx$. Persamaan regresi dianggap linier jika $r \geq 0,999$ (Ayuningtyas 2021). Nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh dari enam baku yang diuji, semuanya berada di atas persyaratan yaitu $\geq 0,999$ dan mendekati nilai 1. Semakin mendekati nilai 1 maka kurva seri

baku yang dianalisis semakin linear. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh matriks terhadap analit pada metode yang digunakan (Aziz 2020).

Batas deteksi (LOD) diuji untuk melihat konsentrasi terendah dari suatu analit yang masih dapat diuji menggunakan metode analisa ini. Sedangkan hasil uji kuantitasi (LOQ) memberikan informasi konsentrasi terendah analit dalam sampel yang masih dapat ditetapkan kadarnya secara akurasi dan presisi sesuai dengan syarat keberterimaan pada metode analisa ini. Dengan mengetahui nilai LOD dan LOQ dapat menjadi pedoman berapa konsentrasi terendah dari enam analit tersebut dalam sediaan suplemen kesehatan yang dipersiapkan untuk melakukan pengujian identifikasi dan penetapan kadar (Aziz 2020).

KESIMPULAN

Kondisi optimal pengujian identifikasi dan penetapan kadar vitamin B1, B3, B6 dan kofein dalam sediaan suplemen kesehatan secara KCKT dengan sistem gradien adalah pada perbandingan komposisi fase gerak ammonium asetat dan asetonitril (25:75). Metode KCKT gradien hasil optimasi pada penelitian ini dapat digunakan untuk analisis identifikasi dan penetapan kadar secara simultan vitamin B1, B3, B6, dan kofein dalam sediaan suplemen kesehatan yang beredar di pasaran karena memberikan hasil analisis yang optimal dilihat dari parameter resolusi pada kesesuaian sistem, selektifitas, presisi, akurasi, linearitas, nilai LOD, dan nilai LOQ metode analisa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penelitian ini yakni Farida Kurniawati atas saran masukan sebagai instruktur pelatihan dari PPPOMN dan Balai POM di Gorontalo atas fasilitas yang diberikan selama penelitian.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada

KONTRIBUSI PENULIS

SBR, UKR, WAB, dan MPK melakukan pengujian laboratorium, FNH melakukan analisis data dan merupakan kontributor dalam penulisan naskah. Semua penulis membaca dan menyetujui naskah akhir.

PENDANAAN

Penelitian ini didanai oleh DIPA Badan POM

DAFTAR PUSTAKA

- Kemeterian Hukum dan Hak Asasi Manusia. 2019. "Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 17 Tahun 2019 tentang Persyaratan Mutu Suplemen Kesehatan."
- Ina PT. 2015. "Bahan Ajar Vitamin Universitas Udayana." *Available from:* https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_pendidikan_1_dir/ea3a3274c98c074a4ae486dd3d6be61f.pdf
- Ariani NLK, Suaniti NM, Sibarani J. 2015. "Perbandingan Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Eluasi Gradien dengan Isokratik pada Penentuan Vitamin B1, B2, dan B6 dalam Sediaan Sirup Multivitamin Secara Simultan. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)* 3(12)
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2017. "Metode Analisa Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional."
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2020. "Farmakope Indonesia Edisi VI." ISBN 978-623-301-017-7.
- Chrissanti RD, Darmawati A, Yuwono M. 2020. "Optimasi Metode KCKT untuk Penetapan Kadar 4-Isobutilasetofenon dan 2-(4-Isobutirilfenil) Asam Propanoat dalam Tablet Ibuprofen." *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian* 7(1)
- Kurnia D, Pujilestari ET, Pamudjo I. 2019. "Pengembangan Metode Penetapan Kadar Metil Prednisolon dalam Sediaan Dry Injection Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)." *Analit : Analytical and Environmental Chemistry*. 4(1)
- Ayuningtyas R, Primaharinastiti R, Yuwono M. 2021. "Optimasi dan validasi metode KCKT untuk identifikasi dan penetapan kadar metabolit nitofuran dalam bakso udang. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia* 8(2)
- Aziz S, Nurhidayati L, Abdillah S, Yuliana ND, Simanjuntak P. 2020. "Optimasi dan Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi untuk Menetapkan Kadar Asam Klorogenat dalam Ekstrak Etanol Daun Yakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson)." *Alchemy Jurnal Penelitian Kimia* 16 (1). p. 67-66.

Burges C. 2001. "Valid Analytical Method and Procedures." *Royal Society of Chemistry* p. 9-14, 57-59.

AOAC International. 2016. "Guideline for Standard Method Performance Requirements." *Appendix f*.