

DOI: <http://dx.doi.org/10.33846/sf13nk414>

Analisis Metampiron, Vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ secara Simultan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom Zic-HILIC

Moh. Rivaldi Mappa

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi; mohrivaldimappa@gmail.com (koresponden)

Iswandi

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi; iswandi2504@gmail.com

Supriyadi

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi; supriusb@gmail.com

ABSTRACT

Determination of dosage levels needs to be done to maintain the quality of the preparation itself, so that the analytical method becomes an important part in examining pharmaceutical formulations in terms of quality control and safety. Therefore, it is necessary to study the determination of the levels of methampyrone, vitamins B₁, B₆, and B₁₂ in multicomponent drugs simultaneously using Zic-HILIC column high performance liquid chromatography (HPLC). This literature review involved national and international research articles related to the analysis of methampyrone, vitamins B₁, B₆, and B₁₂ in multicomponent drugs using the Zic-HILIC column HPLC method. Literature was obtained from several Elsevier, National Center for Biotechnology Information (NCBI), and Google Scholar. Based on the results of the literature study, it can be seen that the conditions of high performance liquid chromatography using a Zic-HILIC column which includes the composition of the mobile phase, the velocity of the mobile phase, the type of buffer, the pH of the mobile phase, the concentration of the buffer and the type of organic solvent affect the analysis process of methampyrone, vitamins B₁, B₆, and B₁₂ simultaneously based on chromatographic parameters namely retention time, selectivity, retention factor, resolution, tailings factor, and the number of theoretical plates. The wavelengths that can be used to detect drug and vitamin mixtures are 272 and 275 nm. The solvent composition that can be used is a mixture of water, acetonitrile and buffer. The best speed of the mobile phase in the analysis process is 0.8 mL/minute. The types of buffers that can be used are ammonium formate, ammonium acetate, sodium dihydrogen phosphate and sodium sulfite with a buffer concentration of 10 mM and a pH of the mobile phase ranging from 3-6.

Keywords: high performance liquid chromatography; Zic-HILIC; methampyrone; vitamin; multicomponent

ABSTRAK

Penetapan kadar sediaan perlu dilakukan untuk menjaga mutu dari sediaan itu sendiri, sehingga metode analisis menjadi bagian penting dalam pemeriksaan formulasi sediaan farmasi dalam hal kontrol kualitas dan keamanannya. Maka diperlukan kajian penetapan kadar metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ dalam obat multikomponen secara simultan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom Zic-HILIC. Kajian literatur ini melibatkan artikel-artikel penelitian nasional maupun internasional, yang berhubungan dengan analisis metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ dalam obat multikomponen menggunakan metode KCKT kolom Zic-HILIC. Literatur diperoleh dari beberapa Elsevier, National Center for Biotechnology Information (NCBI), dan Google Scholar. Berdasarkan hasil studi literatur dapat diketahui bahwa kondisi kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom Zic-HILIC yang meliputi komposisi fase gerak, kecepatan fase gerak, jenis buffer, pH fase gerak, konsentrasi buffer dan jenis pelarut organik mempengaruhi proses analisis metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ secara simultan berdasarkan parameter kromatografi yakni waktu retensi, selektivitas, faktor retensi, resolusi, faktor *tailing*, dan jumlah lempeng teori. Panjang gelombang yang dapat digunakan untuk mendeteksi campuran obat dan vitamin adalah 272 dan 275 nm. Komposisi pelarut yang dapat digunakan adalah campuran air, asetonitril dan buffer. Kecepatan fase gerak pada proses analisis yang paling baik adalah 0,8 mL/menit. Jenis buffer yang dapat digunakan adalah amonium format, amonium asetat, natrium dihidrogen fosfat dan natrium sulfat dengan konsentrasi buffer 10 mM serta pH fase gerak berkisar antara 3-6.

Kata kunci: kromatografi cair kinerja tinggi; Zic-HILIC; metampiron; vitamin; multikomponen

PENDAHULUAN

Vitamin merupakan senyawa kimia yang dibutuhkan oleh tubuh manusia dalam jumlah kecil untuk memelihara fungsi metabolisme normal. Vitamin tidak dapat disintesis oleh tubuh sehingga vitamin harus diperoleh dalam bentuk jadi dari suplemen atau bahan makanan. Beberapa vitamin sering dikombinasikan dengan obat tertentu menjadi satu sediaan, salah satunya obat multikomponen yang mengandung metampiron, vitamin B₁, B₆ dan B₁₂ yang banyak digunakan untuk meringankan keluhan rasa sakit yang disebabkan oleh neuralgia dan neuritis terutama pada keadaan sakit yang berat^(1,2)

Proporsi kandungan zat aktif dalam formula sediaan obat multikomponen sangat berbeda, akibatnya penetapan kadar dalam obat tersebut menjadi sulit untuk dilakukan. Selain itu, sifat fisika-kimia dari zat aktif juga menyebabkan obat multikomponen ini sulit untuk ditetapkan kadarnya. Salah satunya kelarutan dari masing-masing zat aktif. Penetapan kadar terhadap suatu sediaan perlu dilakukan untuk menjaga mutu dari sediaan itu sendiri, sehingga metode analisis menjadi bagian penting dalam pemeriksaan formulasi sediaan farmasi dalam hal kontrol kualitas dan keamanannya⁽³⁾.

Beberapa metode yang dapat digunakan untuk menganalisis metampiron dan vitamin baik dalam sediaan tunggal maupun campuran yaitu chemiluminescence, KLT densitometri, analisis elektroforesis, titrasi, mikrobiologi, spektrofotometri maupun kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Beberapa dari metode ini akurat, namun sebagian besar dari metode-metode ini membutuhkan waktu yang lama karena pelaksanaannya yang relatif rumit dan tidak dapat membedakan beberapa kelompok vitamin B serta spesifisitas dan akurasi kuantitatif sehubungan dengan penentuan vitamin larut air sangat diragukan sehingga perlu dilakukan pengembangan metode analisis yang sederhana, cepat dan akurat dalam penetapan kadar zat dalam campuran^(4,5).

Menurut Chotimah mengembang-kan dan memvalidasi metode pemisahan metamizole, thiamin dan piridoksin dalam sediaan tablet multikomponen secara simultan menggunakan KCKT kolom *reverse phase*, fase gerak PIC : metanol : asam asetat (700 : 300 : 4) dengan kecepatan fase gerak 1,2 mL/menit dan diamati pada panjang gelombang 275 nm. Selain itu, Iswandi (2012) melaporkan pengembangan metode pemisahan multivitamin larut air secara simultan dapat dilakukan dengan KCKT kolom Zic-HILIC (*Hydrophilic interaction liquid chromatography*), dimana pemisahan terbaik dicapai menggunakan fase gerak air : asetonitril : ammonium asetat (100 mM pH 5.8) = 0-2,5 menit (10 : 90 : 0) dan 10-12,5 menit (5 : 50 : 45) dengan kecepatan fase gerak 2 mL/menit. HILIC adalah suatu model pemisahan yang sangat efektif untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bersifat polar^(5,6).

Saat ini belum ada artikel *review* yang membahas mengenai teknik analisis metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ dalam obat multikomponen menggunakan KCKT kolom Zic-HILIC sehingga penelitian ini akan membahas berbagai teknik analisis campuran obat dan vitamin beserta validasi metodenya yang dirangkum dari berbagai penelitian dan pustaka terkait. Validasi metode analisis adalah suatu tahapan penting dalam penjaminan mutu analisis kuantitatif. Metode analisis yang digunakan dalam riset, perlu dilakukan uji kesesuaian sistem dengan tujuan memastikan keefektifan sistem operasional akhir sebelum digunakan meskipun menggunakan peralatan yang sama. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode analisis yang paling baik untuk menentukan kadar metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ dalam obat multikomponen secara simultan, dimana dalam sekali analisis dapat diperoleh kadar dari keseluruhan komponen obat dan vitamin tanpa adanya pemisahan secara bertingkat terlebih dahulu.

METODE

Acuan untuk merumuskan pertanyaan menggunakan “PICO” (*Population in Question, Intervention of Interest, Comparator dan Outcome*). Berdasarkan judul penelitian kita dapat menentukan “PICO” tersebut.

1. (P) *Population* adalah metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂.
2. (I) *Intervention* adalah optimasi kondisi KCKT.
3. (C) *Comparator*; tidak ada pembanding atau intervensi.
4. (O) *Outcome* adalah kondisi optimum KCKT kolom Zic-HILIC dan validasi metode KCKT.

Untuk menyusun protokol *review* analisis metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ secara simultan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi kita menggunakan metode PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta Analyses*).

Strategi pencarian dilakukan mengacu pada protokol yang telah dibuat dan menentukan sumber *database* untuk pencarian data. Ekstraksi data dapat dilakukan setelah proses protokol telah dilakukan dengan menggunakan metode PRISMA, ekstrasi data dapat dilakukan secara manual dengan membuat formulir yang berisi tentang; peneliti, nama jurnal atau konferensi, tahun, judul, metode, dan hasil kuantitatif.

Setelah melewati tahap protokol sampai pada ekstraksi data, maka analisis data dilakukan dengan menggabungkan semua data yang telah memenuhi kriteria inklusi menggunakan teknik secara deskriptif, merangkum isi jurnal dan mencari keterkaitan antar jurnal melalui hasil penelitian yang didapatkan sehingga diperoleh suatu ringkasan yang membahas permasalahan yang telah dirumuskan.

HASIL

Hasil *literature review* dari penelitian ini dapat diamati pada Tabel 1. Ada 8 pustaka yang membahas tentang teknik analisis campuran obat dan vitamin yang telah *direview*. Beberapa aspek yang dikaji dari hasil penelitian tersebut adalah panjang gelombang pendeteksian senyawa, komponen fase gerak, kecepatan fase gerak, jenis buffer, konsentrasi buffer, pH dan jenis pelarut yang digunakan pada proses analisis. Selain itu, pada hasil *review* juga dikaji tentang validasi metode yang digunakan oleh masing-masing pustaka untuk menjamin mutu dari metode analisis yang digunakan.

Tabel 1. Hasil *literature review*

No.	Judul	Penulis, penerbit	Metode	Hasil
1.	Pemisahan multi-vitamin larut air secara simultan dengan kromatografi cair kinerja tinggi ⁽⁶⁾	Iswandi. <i>Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga</i> . 2012	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom Zic-HILIC dan Detektor Diode Array	Panjang gelombang optimum yang digunakan untuk analisis thiamin HCl, piridoksin HCl, nikotinamid, riboflavin, sianokobalamin dan asam askorbat yaitu 272 nm. Komposisi fase gerak yang memberikan pemisahan optimal adalah air : asetonitril : buffer pada perbandingan 10 : 90 : 0 menit ke 0 – 2,5 dan 5 : 50 : 45 pada menit ke 10 – 12,5. Kecepatan fase gerak yang memberikan pemisahan optimal adalah 2 mL/menit. Penambahan buffer amonium asetat pH 5,8 dengan konsentrasi 100 mM pada fase gerak memberikan pemisahan yang optimal.

No.	Judul	Penulis, penerbit	Metode	Hasil
				Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan validasi metode dengan nilai $\alpha > 1$, $r = 0,999$, % recovery 80 – 110 %, $KV < 2$ %, batas deteksi dan batas kuantitas kurang dari konsentrasi terkecil yang digunakan.
2.	HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column(7)	Karatapanis AE, Flamegos YC, Stalikas CD. <i>Journal Separation Science</i> . 2009.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom Diol HILIC dan Detektor Diode Array	ACN terbukti menawarkan pemisahan yang unggul untuk senyawa yang diuji dibandingkan dengan metanol, isopropanol, dan THF. Pemisahan dan analisis isokratik dicapai untuk enam vitamin (B1, B2, asam nikotinat / nikotinamida, B6 dan C) pada CAN-H ₂ O 90:10, yang mengandung amonium asetat 10 mM, trietilamina 20 mM, pH 5,0, menggunakan laju alir 0,8 mL / menit, sementara sistem elusi gradien diperlukan untuk menyelesaikan campuran dari delapan vitamin yang larut dalam air. Metode HILIC telah divalidasi dan berhasil diterapkan pada analisis formulasi farmasi dan minuman energi tanpa adanya pemisahan yang bertingkat-tingkat yang memakan waktu.
3.	Analysis of vitamin B1 in dry-cured sausages by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and diode array detection(8)	Gratacós-Cubarsí M, Sárraga C, Clariana M, Regueiro JAG, Castellari M. <i>Meat Science</i> . 2011	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom Luna HILIC dan Detektor Diode Array	Panjang gelombang optimum yang digunakan untuk analisis vitamin B ₁ adalah 270 nm. pH buffer 5,8 menghasilkan pemisahan yang paling baik. Elusi gradien linier dilakukan antara pelarut A [asetonitril: 50 mM amonium asetat pH 5,8 (90:10 v/v)] dan pelarut B [asetonitril: 10 mM amonium asetat pH 5,8 (50:50 v/v)] dengan memvariasikan B% dari 0 hingga 10% dalam 8 menit. Kecepatan alir fase gerak 0,5 mL/menit. Waktu retensi vitamin B ₁ adalah 7,3 menit.
4.	Simultaneous determination of metamazole, thiamine and pyridoxine in multicomponent(5)	Chotimah C, Sudjadi, Riyanto S, Rohman A. <i>Journal of Food and Pharmaceutical Sciences</i> . 2014.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik dan Detektor Spektrofotometri UV-Vis	Panjang gelombang deteksi UV adalah 275 nm. Pemisahan yang optimal dicapai pada kondisi KCKT sebagai berikut, yaitu perbandingan fase gerak PIC : metanol : asam asetat (700 : 300 : 4), dan laju alir 1,2 mL/menit. Metode analisis yang digunakan memenuhi persyaratan validasi metode dengan $r = 0,999$, $RSD < 2$ %, % recovery 98 – 102 %.
5.	Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: A comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in a breakfast cereal matrix(9)	Langer S, Lodge JK. <i>Journal of Chromatography B</i> . 2014.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom HILIC dan Detektor Diode Array	Ke enam vitamin B berhasil terdeteksi dengan kondisi KCKT yaitu elusi gradien dari 100% sampai 60% pelarut B (10 mM amonium asetat, pH 5,0, dalam fase gerak asetonitril : air (95 : 5 v/v)), serta kecepatan fase gerak 0,8 mL/menit. Waktu retensi (0,96 – 11,81 menit), keterulangan intra-day (CV 1,6 – 3,6), variabilitas inter-day (1,8 – 11,1) dan linearitas (0,9877 – 0,9995) tetap baik dalam kondisi ini dengan batas deteksi yang bervariasi dari 6,6 – 164,6 ng/mL dan batas kuantitas antara 16,8 – 548,7 ng/mL.
6.	RP-HPLC determination of vitamins B1, B3, B6, folic acid and B12 in multivitamin tablets(10)	Amidžić R, Brboric J, Čudina O, Vladimirov S. <i>Journal of Serbian Chemical Society</i> . 2005.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik dan Detektor Spektrofotometri UV-Vis	Panjang gelombang detektor UV-Vis untuk penentuan vitamin B ₁ , B ₃ , B ₆ dan asam folat adalah 290 nm, sedangkan untuk vitamin B ₁₂ adalah 550 nm. Determinasi vitamin B ₁ , B ₃ , B ₆ dan asam folat berhasil dilakukan menggunakan kolom Supelcosil ABZ ⁺ , metanol – 5 mM natrium asam heptanesulfonate / 0,1% trietilamin TEA (25 : 75 V/V), pH 2,8 sebagai fase gerak dan laju alir 1,0 mL/menit. Determinasi vitamin B ₁₂ dilakukan menggunakan kolom Suplex pKb-100, metanol : air (22 : 78 V/V) sebagai fase gerak dengan laju alir 0,8 mL/menit. Parameter inearitas menunjukkan hasil yang baik dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,99. Nilai BD (0,0125 – 0,625) dan BK (0,025 – 1,250) yang diperoleh memenuhi persyaratan yakni lebih kecil dari konsentrasi terkecil analit Hasil dari parameter akurasi dan presisi cukup baik dengan rentang % perolehan kembali 90,4 – 108,5 % dan RSD 0,5 – 4,1 %.
7.	Determination of tramadol, metamizole, ropivacaine and bupivacaine in analgesic mixture samples by HPLC with DAD detection(11)	Salmérón-García A et al. <i>Journal of Chromatographic Science</i> . 2009.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom Fase Terbalik C18 dan Detektor Diode Array	Pemisahan berhasil dicapai menggunakan kolom C18, komposisi fase gerak (sistem isokratik) asetonitril-metanol-air (10:25:65 v/v) dengan laju alir 0,8 mL/menit, yang ditahan pada pH 3,0 buffer natrium dihidrogen fosfat 0,05 M. Natrium sulfat dengan konsentrasi 0,5 mg/mL mampu mencegah hidrolisis metampiron menjadi 4-MMA. Panjang gelombang diode array yang digunakan untuk deteksi sampel adalah 230 nm. Metode yang digunakan linear dalam range 2,2 – 80,0 mg/L untuk tramadol, 4,1 – 140,0 mg/L untuk metampiron, 2,3 – 40,0 mg/L untuk ropivacain dan 2,9 – 40,0 mg/L untuk bupivacain. Metode yang digunakan memiliki linearitas yang baik, dengan koefisien korelasi 99,00%. BK dan BD yang diperoleh juga memenuhi syarat, dimana nilai BK dan $BD \leq$ konsentrasi terkecil analit. Parameter akurasi menunjukkan metode ini memiliki tingkat akurasi yang sangat baik dengan % recovery berkisar antara 99,3 – 100,9 %, serta parameter presisi memberikan hasil yang cukup baik dengan $RSD < 2,5$ %.
8.	HPLC method development and validation for simultaneous assay	Maritha V. <i>Jurnal Farmasi Indonesia</i> . 2016.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom Fase Terbalik C8	Kondisi optimal KCKT dalam pemisahan campuran metampiron, tiamin dan piridoksin adalah fase gerak yang terdiri dari buffer fosfat 35 mM pH 3,0 : metanol (80 : 20), laju alir 1,0 mL/menit.

No.	Judul	Penulis, penerbit	Metode	Hasil
	of metampiron, thiamine and pyridoxine in tablet(12)		dan Detektor Photo Diode Array.	Metampiron, thiamin dan piridoksin terdeteksi pada panjang gelombang 275 nm dan 361 nm untuk sianokobalamin. Hidrolisis metampiron berhasil dihambat dengan penambahan larutan yang mengandung 0,5 mg/mL natrium sulfat. Hasil validasi menunjukkan spesifitas dan linearitas detektor yang baik dengan $r > 0,999$. Akurasi (% recovery) metampiron, thiamin dan piridoksin secara berturut-turut adalah 100,26%, 99,09% dan 100,03%. Metode yang digunakan memiliki presisi yang baik dengan RSD metampiron, thiamin dan piridoksin secara berturut-turut adalah 2,0912%, 1,4489% dan 0,8418%. Dalam uji <i>robustness</i> , perubahan kecil pada pH fase gerak menghasilkan puncak yang tidak simetris dan resolusi yang lebih rendah. Metode yang telah divalidasi berhasil diterapkan untuk uji simultan metampiron, thiamin dan piridoksin dalam sediaan tablet.

PEMBAHASAN

Penentuan Panjang Gelombang

Tujuan pemilihan panjang gelombang *overlepping* sebagai panjang gelombang pada sistem KCKT adalah agar senyawa campuran obat dan vitamin dapat dideteksi oleh detektor pada sistem KCKT. Berdasarkan penelitian Iswandi (2012) panjang gelombang optimum yang digunakan untuk analisis multikomponen yang terdiri dari thiamin HCL, piridoksin HCL, nikotinamid, riboflavin, sianokobalamin, dan asam askorbat menggunakan detektor Diode Array pada KCKT kolom Zic-HILIC adalah 272 nm karena pada panjang gelombang tersebut senyawa-senyawa vitamin ini dapat memberikan serapan. Selain itu, Chotimah *et al.* (2014) melaporkan penetapan kandungan metampiron, thiamin, dan piridoksin dalam tablet multikomponen secara simultan menggunakan detektor UV-Vis pada RP-HPLC dengan panjang gelombang 275 nm. Hasil ini didukung oleh Maritha (2016) yang melaporkan bahwa analisis metampiron, thiamin, dan piridoksin dalam tablet secara simultan menggunakan KCKT dapat terdeteksi pada panjang gelombang 275 nm.^(5,6,12)

Pengaruh Komposisi Fase Gerak

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Iswandi (2012), komposisi fase gerak yang memberikan pemisahan yang optimal pada campuran multivitamin menggunakan KCKT kolom Zic-HILIC adalah fase gerak air : asetonitril : buffer (10 : 90 : 0) pada 0-2,5 menit dan fase gerak air : asetonitril : buffer (5 : 50 : 45) pada 10-12,5 menit (tabel 1). Pemilihan fase gerak tersebut didasarkan pada resolusi masing-masing analit $> 1,5$, jumlah lempeng teori lebih banyak dan waktu analisisnya yang relatif cepat. Pemisahan yang baik pada KCKT terjadi apabila harga R_s mendekati atau lebih dari 1,5 karena memberikan puncak yang baik, sedangkan suatu kolom dikatakan efisien dalam memisahkan analit jika jumlah pelat teori (N) yang dikandung semakin banyak.^(6,13)

Karatapanis *et al.* (2009) melaporkan pemisahan campuran vitamin larut air (thiamin, riboflavin, asam nikotinat, nikotinamida, piridoksin, asam folat, sianokobalamin dan asam askorbat) menggunakan KCKT kolom Diol-HILIC. Perbandingan fase gerak yang digunakan adalah 90 : 10 sampai 50 : 50 (ACN : air) (tabel 1). Pada fase gerak yang terdiri dari 90% ACN, pemisahan isokratik yang baik diperoleh untuk enam vitamin larut air yakni nikotinamid, piridoksin, riboflavin, asam nikotinat, asam askorbat, dan asam tiamin.⁽⁷⁾

Gratacós-Cubarsí *et al.* (2011) mengaplikasikan KCKT kolom Luna-HILIC untuk mengukur konsentrasi thiamin dalam sosis kering. Elusi gradien linier dilakukan antara pelarut A (ACN : buffer (90 : 10)) dan pelarut B (ACN : buffer (50 : 50)) dengan memvariasikan B% dari 0 hingga 10% (tabel 1). Disisi lain, pemisahan yang optimal dari metampiron, thiamin dan piridoksin dalam sediaan tablet multikomponen berhasil dilakukan oleh Chotimah *et al.* (2014) menggunakan KCKT kolom fase terbalik dengan perbandingan fase gerak PIC : metanol : asam asetat (700 : 300 : 4) (tabel 1). Hasil ini didasarkan pada waktu analisis yang cepat, R_s dari masing-masing analit $> 1,5$ dan indeks kemurnian puncak yang mendekati atau sama dengan 1. Berdasarkan hal tersebut, maka sistem pemisahan yang digunakan mampu menghasilkan puncak yang murni. Indeks kemurnian puncak merupakan salah satu parameter yang menentukan spesifitas metode. Langer dan Lodge (2014) juga mengaplikasikan HILIC dalam analisis thiamin, riboflavin, asam nikotinat, nikotinamin, piridoksin, asam folat, dan asam askorbat dalam matriks sereal, dimana pemisahan yang optimal terjadi pada komposisi fase gerak ACN : air (95 : 5) (tabel 1). Hasil ini didasarkan pada waktu analisis yang cepat dengan resolusi *peak* yang baik ($R_s > 1,5$), $\alpha > 1$ dan faktor kapasitas (k') > 1 (kecuali asam askorbat).^(5,8,9)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Salmerón-García *et al.* (2009), pemisahan campuran obat tramadol, metampiron, ropivakain, dan bupivakain tercapai pada komposisi fase gerak ACN : metanol : air (10 : 25 : 65) menggunakan KCKT fase terbalik (tabel 1). ACN dan metanol diuji pada persentase yang berbeda dalam fase gerak, dimana semua obat terelusi pada waktu retensi yang lebih pendek ketika persentase pelarut organik meningkat. Pemisahan dari campuran obat ini juga menghasilkan bentuk *peak* yang sangat baik yakni $T > 1$ dan $R_s > 1,5$.⁽¹¹⁾

Amidžić *et al.* (2005) melaporkan pemisahan vitamin B₁, B₃, B₆, B₁₂, dan asam folat dalam sediaan multivitamin menggunakan KCKT fase terbalik dengan 2 jenis kolom yang berbeda yakni kolom supelcosil ABZ⁺ untuk determinasi vitamin B₁, B₃, B₆, dan asam folat. Kolom suplex pKb-100 untuk vitamin B₁₂. Penentuan vitamin B₁, B₃, B₆, dan asam folat secara simultan tercapai pada komposisi fase gerak metanol – 5 mM natrium asam heptanesulfonate / 0,1% trietilamin TEA (25 : 75 V/V), sedangkan pemisahan vitamin B₁₂ tercapai pada

komposisi fase gerak metanol : air (22 : 78 V/V) (tabel 1). Hasil ini didasarkan pada nilai $R_s > 1,5$, $\alpha > 1$, dan waktu analisis yang cepat. Identifikasi dan kuantifikasi vitamin B₁₂ dilakukan secara terpisah karena konsentrasinya dalam sediaan multivitamin sangat kecil.⁽¹⁰⁾

Pengaruh Kecepatan Fase Gerak

Kecepatan fase gerak atau laju alir merupakan faktor penting yang menentukan keberhasilan melakukan pemisahan menggunakan KCKT. Laju alir yang baik yakni apabila dapat memisahkan suatu senyawa dalam waktu yang cepat tanpa adanya pemanjangan puncak (*tailing*). Laju alir menjadi faktor yang penting karena akan mempengaruhi luas puncak dari kromatogram, waktu retensi dan resolusi dari suatu kromatogram.⁽¹⁴⁾ Tabel 1 menunjukkan kecepatan fase gerak dari setiap literature yang di-review.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Karatapanis *et al.* (2009), laju alir fase gerak 0,8 mL/menit (tabel 1) dapat digunakan untuk menganalisis campuran vitamin larut air, mencapai resolusi yang baik yaitu $> 2,7$ ($R_s > 1,5$) dengan total waktu analisis ~30 menit. Menurut Amidžić *et al.* (2005), kecepatan fase gerak yang optimal dalam penentuan vitamin B₁, B₃, B₆, dan asam folat dalam sediaan multivitamin adalah 1,0 mL/menit dan 0,8 mL/menit untuk vitamin B₁₂ (tabel 1). Hal ini didasarkan pada nilai $R_s > 1,5$, $\alpha > 1$, dan waktu analisis yang cepat. Selain itu, Salmerón-García *et al.* (2009) juga melaporkan bahwa laju alir fase gerak 0,8 mL/menit (tabel 1) menghasilkan pemisahan yang optimal dari campuran tramadol, metampiron, ropivakain, dan bupivakain didasarkan pada bentuk *peak* yang sangat baik yakni $T > 1$ dan $R_s > 1,5$.^(7,10,11)

Iswandi (2012) melakukan optimasi pengaruh kecepatan fase gerak dalam menganalisis campuran multivitamin. Pemisahan yang optimal terjadi pada kecepatan 2 mL/menit (tabel 1), yang didasarkan oleh harga resolusi $> 1,5$, dan jumlah N yang lebih banyak. Sementara itu, penelitian yang dilakukan Gratacós-Cubarsí *et al.* (2011) menunjukkan bahwa pemisahan terbaik dicapai pada laju alir fase gerak 0,5 mL/menit (tabel 1). Chotimah *et al.* (2014) membandingkan laju alir 1 mL/menit dan 1,2 mL/menit untuk memisahkan campuran metampiron, thiamin, dan piridoksin. Laju alir 1,2 mL/menit dipilih menjadi laju alir yang digunakan (tabel 1) karena memberikan pemisahan yang baik dalam waktu yang wajar (waktu analisis cepat), R_s dari masing-masing analit $> 1,5$ dan indeks kemurnian puncak mendekati atau sama dengan 1. Maritha (2016) melaporkan bahwa laju alir fase gerak 1,0 mL/menit (tabel 1) pada analisis campuran metampiron, thiamin, dan piridoksin menggunakan KCKT fase terbalik mampu memberikan pemisahan analit yang baik dengan nilai resolusi $> 1,5$ dan jumlah lempeng teori > 2000 .^(5,6,8,12)

Berdasarkan penelitian Langer dan Lodge (2014), kecepatan fase gerak yang optimal dalam memisahkan enam vitamin larut air adalah 0,8 mL/menit (tabel 1). Hal ini didasarkan pada waktu analisis yang cepat dengan resolusi *peak* yang baik ($R_s > 1,5$), $\alpha > 1$, dan faktor kapasitas (k') > 1 (kecuali asam askorbat). Nicotinamide, piridoksin, dan riboflavin terpisah dalam waktu 3 menit dengan faktor retensi $k' > 1$, sedangkan asam nikotinat, asam folat, dan thiamin terpisah pada menit ke 11,8 dengan $k' 22,6$.⁽⁹⁾

Pengaruh Jenis Buffer

Suatu penelitian menunjukkan bahwa tidak adanya garam/buffer dalam fase gerak mengakibatkan retensi yang terlalu lama dan puncak yang sangat luas. Pertimbangan penggunaan buffer juga dilakukan karena metampiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ tidak stabil dengan adanya perubahan pH.⁽¹⁵⁾

Perbedaan signifikan antara amonium asetat dan amonium format diteliti oleh Karatapanis *et al.* (2009). Amonium format memberikan karakteristik retensi yang berubah untuk asam nikotinat, asam L-askorbat, dan thiamin, dibandingkan dengan amonium asetat yang menghasilkan waktu analisis yang lebih lama, jumlah lempeng teori yang besar, $T > 1$, $R_s > 1,5$, dan $k' > 1$.⁽⁷⁾

Penelitian yang dilakukan oleh Iswandi (2012), menunjukkan bahwa penggunaan buffer amonium asetat (tabel 1) menghasilkan pemisahan yang optimal pada campuran multivitamin dengan R_s dari masing-masing analit $> 1,5$, jumlah lempeng teori yang besar serta waktu analisisnya cepat. Selain itu, Langer dan Lodge (2014) membandingkan penggunaan buffer amonium format dan amonium asetat dalam fase gerak untuk menganalisis enam vitamin larut air, dimana penggunaan kedua jenis buffer ini menghasilkan waktu retensi dari masing-masing analit yang bervariasi. Secara keseluruhan, amonium asetat menghasilkan retensi dan sifat pemisahan yang lebih baik daripada amonium format (tabel 1).^(6,9)

Salmerón-García *et al.* (2009) membandingkan penggunaan asam fosfat, natrium dihidrogen fosfat dan dinatrium hidrogen fosfat sebagai buffer fase gerak dalam pemisahan campuran obat yang mengandung metampiron, dimana buffer natrium dihidrogen fosfat menghasilkan pemisahan obat yang paling optimal (tabel 1). Hal ini didasarkan pada bentuk *peak* yang sangat baik yaitu nilai dari faktor *tailing* ($T > 1$) dan $R_s > 1,5$. Selain buffer untuk fase gerak, Salmerón-García *et al.* (2009) juga menggunakan natrium sulfit sebagai buffer untuk menjaga kestabilan dari metampiron yang mudah mengalami hidrolisis. Penelitian Maritha (2016) juga melaporkan bahwa penambahan natrium sulfit ke dalam fase gerak dan buffer fosfat mampu menghambat hidrolisis dari metampiron pada proses analisis campuran metampiron, thiamin dan piridoksin sehingga diperoleh pemisahan yang baik.^(11,12)

Pengaruh pH Fase Gerak

pH fase gerak merupakan faktor kromatografi yang penting karena dapat memengaruhi kondisi muatan fase diam dan zat terlarut polar. Secara umum, zat terlarut yang diberi muatan lebih hidrofilik daripada bentuk netralnya dan dengan demikian tertahan lebih kuat dalam HILIC.

Karatapanis *et al.* (2009) meneliti efek pH fase gerak pada retensi vitamin yang larut dalam air pada fase diol. Keadaan muatan nikotinamid, piridoksin, dan riboflavin tidak dipengaruhi oleh pH fase gerak, oleh karena itu retensi tetap tidak berubah dalam kisaran pH yang digunakan dalam penelitian yakni pH 3-6. Dalam konteks ini, amonium asetat digunakan untuk pH 4.0-6.0, sedangkan untuk pH 3.0 yang berada di luar kisaran pH amonium asetat, digunakan amonium format. Peningkatan retensi diamati untuk asam nikotinat ($pK_{a1} \sim 2.2$) dan asam l-askorbat ($pK_{a1} \sim 4.1$) pada pH yang lebih tinggi karena meningkatnya deprotonasi. pH fase gerak juga merupakan cara yang efektif untuk mencapai pemisahan yang diinginkan melalui perubahan selektivitas zat terlarut. Terjadi ko-elusi untuk elusi awal vitamin larut air pada pH yang lebih rendah yaitu pH 3 dan 4, tetapi resolusi meningkat ketika pH fase gerak meningkat menjadi pH 5 dan 6. Dengan demikian, buffer amonium asetat dipilih juga mempertimbangkan bahwa garam ini menunjukkan kapasitas penyangga yang lebih baik pada pH 5,0 dibandingkan dengan amonium format. Penggunaan buffer amonium asetat pada pH 5,0 memberikan pemisahan yang baik berdasarkan pada nilai $R_s > 1,5$, jumlah N yang besar dan $T > 1$ (tabel 1).⁽⁷⁾

Penelitian yang dilakukan oleh Iswandi (2012) menunjukkan bahwa pH buffer fase gerak 5,8 (tabel 1) menghasilkan pemisahan yang optimal dari campuran multivitamin didasarkan pada $R_s > 1,5$, jumlah lempeng teori yang lebih banyak dan waktu analisis yang cepat, hal ini disebabkan oleh interaksi yang terjadi pada kolom Zic-HILIC yang digunakan adalah elektrostatik lemah. Selain itu, berdasarkan penelitian Langer dan Lodge (2014), buffer amonium asetat pada pH 5,0 (tabel 1) menghasilkan pemisahan yang optimal untuk enam vitamin larut air berdasarkan pada beberapa parameter KCKT yakni waktu analisis yang cepat dengan resolusi *peak* yang baik ($R_s > 1,5$), $\alpha > 1$, dan faktor kapasitas (k') > 1 (kecuali asam askorbat).⁽⁶⁾

Salmerón-García *et al.* (2009) melaporkan penggunaan natrium dihidrogen fosfat sebagai buffer fase gerak dalam pemisahan campuran tramadol, metamprion, ropivakain, dan bupivakain menggunakan KCKT, dengan kisaran pH 3-6. Nilai pH yang meningkat memberikan waktu retensi yang lebih besar untuk semua analit yang diteliti. pH 3 dan 4 juga memberikan waktu retensi yang sama namun pH 3 dipilih (tabel 1) untuk menganalisis campuran senyawa-senyawa tersebut karena menghasilkan bentuk puncak yang lebih sempit untuk semua obat ($T > 1$ dan $R_s > 1,5$) karena adanya penurunan pH. Hal ini didukung oleh penelitian Maritha (2016) yang melakukan analisis campuran metamprion dan vitamin larut air menggunakan buffer fosfat dengan pH 3,0 (tabel 1) yang menghasilkan pemisahan yang baik didasarkan pada nilai R_s yang baik yaitu $> 1,5$ dan jumlah $N > 2000$.^(11,12)

Pengaruh Konsentrasi Buffer

Adanya garam penyangga dalam fase gerak dapat secara efektif mengurangi interaksi elektrostatik (baik menarik dan menolak) antara zat terlarut bermuatan dan fase diam pada HILIC. Dalam kasus daya tarik elektrostatik, peningkatan konsentrasi garam menyebabkan berkurangnya retensi zat terlarut bermuatan pada fase diam dengan muatan berlawanan. Efek sebaliknya diamati dalam kasus tolakan elektrostatik, peningkatan konsentrasi garam menghasilkan peningkatan retensi zat terlarut bermuatan pada fase diam dengan muatan yang sama. Konsentrasi garam dalam ulasan ini mengacu pada konsentrasi akhir dalam fase gerak.⁽¹⁶⁾

Karatapanis *et al.* (2009) melaporkan bahwa fase gerak yang mengandung amonium asetat pada konsentrasi 10 mM (tabel 1) menghasilkan pemisahan yang baik, hasil ini didasarkan pada R_s dari masing-masing analit $> 1,5$, jumlah lempeng teori yang besar, $T > 1$, dan $k' > 1$. Penurunan retensi vitamin yang signifikan pada fase diol ketika konsentrasi amonium asetat meningkat dari 5 hingga 20 mM, karena penurunan tarikan elektrostatik. Selain itu, retensi riboflavin dan piridoksin mengalami sedikit peningkatan pada fase diol. Di bawah kondisi eksperimental, riboflavin dalam bentuk netral dan piridoksin sebagian akan bermuatan positif. Tarikan elektrostatik tidak dapat menjelaskan peningkatan retensi piridoksin pada fase diol.⁽⁷⁾

Iswandi (2012) meneliti pengaruh konsentrasi buffer pada fase gerak dalam pemisahan campuran multivitamin. Konsentrasi buffer yang terpilih adalah amonium asetat 100 mM (tabel 1), dimana pada konsentrasi tersebut dicapai pemisahan yang optimal berdasarkan nilai $R_s > 1,5$, jumlah lempeng teori yang lebih banyak dan waktu analisis yang cepat. Kemampuan buffer untuk menyangga analit dapat bekerja dengan baik jika konsentrasi buffer yang digunakan agak tinggi. Penelitian Langer dan Lodge (2014) menunjukkan bahwa pemisahan enam vitamin larut air dicapai dengan menggunakan buffer amonium asetat pada konsentrasi 10 mM (tabel 1). Hasil ini didukung oleh nilai dari beberapa parameter KCKT yang memenuhi persyaratan untuk pemisahan yang baik yaitu $\alpha > 1$, faktor kapasitas (k') > 1 serta waktu analisis yang cepat dengan resolusi *peak* yang baik ($R_s > 1,5$). Metode pemisahan yang membutuhkan fase gerak yang banyak mengandung air, konsentrasi yang ideal dari suatu buffer adalah ≥ 10 mM.^(6,9)

Maritha (2016) menggunakan buffer fosfat dengan konsentrasi 35 mM (tabel 1) dalam menganalisis metamprion, thiamin, dan piridoksin dalam suatu sediaan tablet menghasilkan bentuk kromatogram yang baik dengan $R_s > 1,5$ dan jumlah $N > 2000$, selain itu pada penelitian tersebut juga membandingkan konsentrasi buffer natrium sulfat untuk mempertahankan kestabilan metamprion. Natrium sulfat pada konsentrasi 0,5 mg/mL, 0,7 mg/mL, dan 1,0 mg/mL tidak bisa menghambat terjadinya hidrolisis metamprion hal ini dapat diketahui dengan adanya puncak lain pada hasil kromatogram, sedangkan penambahan natrium sulfat dengan konsentrasi 1,5 mg/mL mampu menghambat hidrolisis metamprion, dimana puncak yang muncul pada kromatogram hanya puncak tunggal dari metamprion. Hal ini berbanding terbalik dengan hasil penelitian Salmerón-García *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa konsentrasi natrium sulfat $> 0,7$ mg/mL menghasilkan puncak kromatografi natrium sulfat yang tumpang tindih dengan puncak metamprion, maka natrium sulfat dengan konsentrasi 0,5 mg/mL dipilih sebagai konsentrasi yang optimal untuk ditambahkan ke fase gerak karena pada konsentrasi 0,7 mg/mL puncak kecil dari natrium sulfat tetap terdeteksi dalam kromatogram. Sementara itu, konsentrasi natrium dihidrogen fosfat sebagai buffer untuk fase gerak dalam analisis campuran obat yang mengandung metamprion adalah 50 mM (tabel 1), karena pada konsentrasi sekian bentuk *peak* yang diperoleh dari pemisahan campuran obat tersebut sangat baik dengan nilai $T > 1$ dan $R_s > 1,5$.^(11,12)

Validasi Metode

Langkah selanjutnya yang dilakukan setelah memperoleh kondisi optimum KCKT adalah validasi metode. Hal ini dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduksibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Tujuan akhir validasi metode adalah untuk menjamin bahwa tiap pengukuran di masa yang akan datang dalam suatu analisis rutin harus cukup dekat dengan nilai kandungan analit sebenarnya, yang terkandung dalam suatu sampel.⁽¹⁷⁾

Iswandi (2012) melaporkan validasi metode KCKT kolom Zic-HILIC dengan kondisi optimum yaitu komposisi fase gerak 10 : 90 : 0 (air : ACN : amonium asetat (100 mM, pH 5,8)) pada 0 – 2,5 menit dan 5 : 50 : 45 pada 10 – 12,5 menit dengan laju alir 1,2 mL/menit. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki selektivitas yang baik, hal ini ditandai oleh nilai $\alpha > 1$ sehingga dapat diketahui bahwa metode ini mampu mendeteksi suatu analit dengan adanya senyawa lain (tabel 1). Selektivitas atau spesifitas merupakan parameter validasi yang paling penting karena jika metode ini tidak spesifik maka parameter validasi lainnya tidak ada artinya. Selain itu, uji linearitas menunjukkan bahwa metode tersebut mampu mendapatkan hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam sampel, dimana pengukuran pada uji linearitas dilakukan dengan menggunakan 5 kadar yang berbeda.^(6,18)

Parameter validasi lainnya yakni akurasi menunjukkan bahwa kadar hasil pengukuran yang diperoleh mendekati kadar sebenarnya atau masuk dalam *range* kriteria persen *recovery* yang berkisar antara 80 – 110% (tabel 1). Akurasi umumnya diperoleh dari percobaan perolehan kembali dengan menambahkan sejumlah senyawa aktif obat ke dalam sampel sebenarnya dan dilaporkan sebagai persen *recovery*. Disisi lain, parameter presisi menunjukkan bahwa alat dan metode yang digunakan memiliki presisi yang baik dengan koefisien variasi (KV) < 2 %. Presisi adalah kedekatan hasil satu sama lain setelah serangkaian pengambilan sampel dari sampel yang sama dan homogen. Parameter ini menunjukkan kesalahan acak atau menengah dalam suatu metode, dan ketepatan prosedur analisis biasanya dinyatakan sebagai varians, standar deviasi, atau koefisien variasi dari serangkaian pengukuran. Sementara itu, BD dan BK yang diperoleh memenuhi persyaratan dimana harga BD dan BK kurang dari konsentrasi terkecil yang digunakan.⁽⁶⁾

Karatapanis *et al.* (2009) juga melakukan validasi metode KCKT kolom diol-HILIC dalam analisis campuran multivitamin dengan kondisi optimum yakni fase gerak ACN : air (90 : 10) yang mengandung amonium asetat 10 mM, trietanolamin 20 mM, pH 5,0 dan laju alir 0,8 mL/menit. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode tersebut efektif dalam penentuan enam vitamin larut air dengan memenuhi parameter akurasi dan presisi yang dibuktikan dengan analisis vitamin larut air dalam sediaan sirup dan minuman energi. Hal ini didukung oleh hasil uji kesesuaian sistem KCKT yang menunjukkan bahwa metode ini memiliki jumlah lempeng teori > 2000, serta faktor *tailing* dan faktor retensi > 1.⁽⁷⁾

Kondisi KCKT kolom HILIC dengan komposisi fase gerak ACN : air (95 : 5), buffer amonium asetat pH 5,0 dengan konsentrasi 10 mM dan laju alir 0,8 mL/menit telah divalidasi oleh Langer dan Lodge (2014) dalam penetapan kadar vitamin larut air. Hasil perhitungan linearitas menunjukkan bahwa nilai koefisien korelasi dari analit adalah $r \geq 0,995$, sehingga dapat diketahui bahwa analit memberikan respon yang linier dengan konsentrasi yang dianalisis. Hasil validasi parameter BD dan BK memenuhi persyaratan karena nilai BD dan BK lebih kecil dari konsentrasi terkecil analit. Akan tetapi, parameter presisi menunjukkan hasil yang kurang baik karena nilai KV > 2 yakni KV *intra-day* $\leq 3,6\%$ dan *inter-day* $\leq 11,1\%$ (tabel 1).⁽⁹⁾

Kondisi KCKT fase terbalik yang digunakan dalam penetapan kadar campuran tramadol, metampiron, ropivakain, dan bupivakain dengan komposisi fase gerak ACN : metanol : air (10 : 25 : 65), buffer natrium dihidrogen fosfat 50 mM, pH 3,0 dan laju alir 0,8 mL/menit telah divalidasi oleh Salmerón-García *et al.* (2009). Hasil validasi menunjukkan bahwa metode ini memiliki linearitas yang baik dalam kisaran analit yang diteliti dengan koefisien korelasi yang lebih dari 99,00%. BK dan BD yang diperoleh juga memenuhi syarat, dimana nilai BK dan BD \leq konsentrasi terkecil analit. Parameter akurasi menunjukkan metode ini memiliki tingkat akurasi yang sangat baik dengan % *recovery* berkisar antara 99,3 – 100,9 %. Disisi lain, parameter presisi memberikan hasil yang cukup baik dengan RSD < 2,5 % (tabel 1).⁽¹¹⁾

Kondisi optimal KCKT fase terbalik yang digunakan oleh Amidžić *et al.* (2005) dalam identifikasi dan kuantifikasi vitamin B₁, B₃, B₆, B₁₂, dan asam folat dalam sediaan multivitamin dengan komposisi fase gerak metanol – 5 mM natrium asam heptanesulfonat / 0,1% trietilamin TEA (25 : 75 V/V) (laju alir 1,0 mL/menit) dan metanol : air (22 : 78 V/V) (laju alir 0,8 mL/menit) juga telah divalidasi. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode ini memiliki validitas yang baik, hal ini ditandai dengan nilai faktor selektivitas (α) > 1 yakni tidak ada puncak yang saling tumpang tindih. Semua eksipien terelusi pada waktu yang berbeda dan tidak mengganggu senyawa yang dianalisis.⁽¹⁰⁾

Metode ini juga menunjukkan linearitas yang baik dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,99 karena menghasilkan *peak area* yang sesuai dengan konsentrasi analit, serta nilai BD dan BK yang diperoleh memenuhi persyaratan yakni lebih kecil dari konsentrasi terkecil analit (tabel 1). Sementara itu, hasil dari parameter akurasi dan presisi cukup baik dengan rentang % perolehan kembali 90,4 – 108,5 % dan RSD 0,5 – 4,1 %.⁽¹⁰⁾

Chotimah *et al.* (2014) telah memvalidasi metode yang digunakannya dalam pemisahan metampiron, thiamin, dan piridoksin dalam sediaan tablet multikomponen secara simultan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi kolom fase terbalik, fase gerak PIC : metanol : asam asetat (700 : 300 : 4) dengan kecepatan fase gerak 1,2 mL/menit. Berdasarkan parameter spesifitas, metode yang digunakan bersifat spesifik karena memiliki nilai $R_s > 1,5$ dan indeks kemurnian puncak yang mendekati atau sama dengan 1. Nilai % RSD dari metampiron, thiamin, dan piridoksin pada masing-masing konsentrasi adalah < 2%. Parameter akurasi menunjukkan bahwa kadar hasil pengukuran yang diperoleh mendekati kadar sebenarnya. % *recovery* dari masing-masing analit berkisar antara 98 – 102 %. Hasil uji parameter linearitas menunjukkan nilai koefisien korelasi (r) > 0,999, oleh

karena itu dapat dikatakan bahwa metode yang digunakan menghasilkan *peak area* yang sebanding dengan konsentrasi yang dianalisis (tabel 1).⁽⁵⁾

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil studi literatur yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kondisi KCKT kolom Zic-HILIC yang meliputi komposisi fase gerak, kecepatan fase gerak, jenis buffer, pH fase gerak, konsentrasi buffer dan jenis pelarut organik mempengaruhi proses analisis metamiron, vitamin B₁, B₆, dan B₁₂ secara simultan berdasarkan hasil penilaian parameter kromatografi yakni waktu retensi, selektivitas, faktor retensi, resolusi, faktor *tailing*, dan jumlah lempeng teori. Metode analisis yang digunakan memenuhi persyaratan validasi metode yakni linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi, dan batas kuantitas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Combs GF. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2008.
2. Perhimpunan Dokter Spesialis Saraf Indonesia. Siaran Pers: Neuropati Perifer Diabetes. Indonesia: Merck; 2016.
3. Yolanda M. Validasi Metode Analisis Pseudoefedrin HCL, Guaifenesin Dan Deksklofeniramin Maleate Dalam Obat Flu Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Pasangan Ion. Yogyakarta; Universitas Gadjah Mada; 2015.
4. Zhao L, Li B, Zhang Z, Lin J. Chemiluminescent Flow-Through Sensor for Automated Dissolution Testing for Analgin Tablets Using Manganese Dioxide As Oxide. Journal Sensors and Actuators B: Chemical; 2004. 97; 266-271.
5. Chotimah C, Sudjadi, Riyanto S, Rohman A. Simultaneous Determination of Metamizole, Thiamin and Pyridoxin in Multicomponen. Journal of Food and Pharmaceutical Sciences; 2014;79-82.
6. Iswandi. Pemisahan Multivitamin Larut Air Secara Simultan Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Kolom Zic-HILIC. Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga; 2012.
7. Karatapanis AE, Flamegos YC, Stalikas CD. HILIC Separation and Quantitation of Water-Soluble Vitamins Using Diol Column. Journal Separation Science; 2009;32:909-917.
8. Gratacós-Cubarsí M, Sárraga C, Clariana M, Regueiro JAG, Castellari M. Analysis of Vitamin B1 in Dry-Cured Sausages by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Diode Array Detection. Meat Science; 2011;87:234-238.
9. Langer S, Lodge JK. Determination of Selected Water-Soluble Vitamins Using Hydrophilic Chromatography: A Comparison of Photodiode Array, Fluorescence, and Coulometric Detection, And Validation In A Breakfast Cereal Matrix. Journal of Chromatography B; 2014;960:73-81.
10. Amidžić R, Brborić J, Čudina O, Vladimirov S. RP-HPLC Determination of Vitamins B₁, B₃, B₆, Folic Acid And B₁₂ in Multivitamin Tablets. Journal of Serbian Chemical Society; 2005;70(10):1229-1235.
11. Salmerón-García A, et al. Determination of Tramadol, Metamizole, Ropivacaine and Bupivacaine in Analgesic Mixture Samples by HPLC With DAD Detection. Journal of Chromatographic Science. 2009;47: 231-237.
12. Maritha V. HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Assay of Metamizole, Thiamine and Pyridoxine in Tablet. Jurnal Farmasi Indonesia. 2016;13(2):126-132.
13. Rohman A. Kromatografi Untuk Analisis Obat. Yogyakarta: Graha Ilmu; 2009.
14. Meyer VR. Practical High-Performance Liquid Chromatography 5th Edition. Wiley: Chinchester; 2004.
15. Aversano CD et al. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for The Analysis of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) Toxins. Journal Chromatography; 2005;1081(2):190-201.
16. Guo Y, Gaiki S. Retention and Selectivity of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography. Journal Of Chromatography. 2011;1218:5920-5938.
17. USP. The United States Pharmacopeia: The National Formulary. USP 37 NF 32 Supplement 1. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention; 2014.
18. Gumustas M, Kurbanoglu S, Uslu B, Ozkan SA. UPLC Versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications And Their Validation Parameters. Chromatographia. 2013;76:1365-1427.