

BAB III

METODE

A. Deskripsi Metode Pendekatan Meta Analisis

Menurut Green (2005), meta analisis merupakan suatu metode statistik khusus yang menggabungkan beberapa penelitian sejenis untuk dapat menghasilkan suatu informasi khusus.

Meta analisis merupakan suatu metode penelitian untuk pengambilan simpulan yang menggabungkan dua atau lebih penelitian sejenis sehingga diperoleh data secara kuantitatif yang dilihat dari alat dan bahan yang digunakan, prosedur kerja dari setiap jurnal, sehingga dapat membuat rekapitulasi data tanpa melakukan manipulasi eksperimental.

Proses dalam melakukan meta anlisa antara lain :

1. Mencari artikel penelitian terkait dengan judul penelitian yang digunakan.
2. Melakukan keakuratan jurnal atau artikel melalui <http://sinta.ristekbrin.go.id/> untuk jurnal nasional, sedangkan untuk jurnal internasional dilakukan pengecekan melalui <https://doaj.org/>, <https://www.scopus.com/sources.uri?zone=TopNavBar&origin=searchbasisc>, <https://www.scimagojr.com/>, serta untuk melihat apakah jurnal tersebut predator melalui <https://beallslist.net/>. Jurnal-jurnal tersebut kemudian dikonsultasikan kepada dosen pembimbing untuk di setujui.

3. Melakukan review artikel dan membandingkan artikel-artikel penelitian sebelumnya dengan merujuk pada simpulan umum masing-masing artikel tanpa melakukan analisis statistik.
4. Menyimpulkan hasil perbandingan artikel disesuaikan dengan tujuan penelitian.

B. Informasi Jumlah dan Jenis Artikel

Penelitian ini menggunakan lima jurnal sebagai acuan untuk memperoleh data yang akan digunakan sebagai dasar penyusunan hasil serta pembahasan yang akan dianalisa. Artikel yang digunakan bersumber dari :

1. 1 jurnal nasional terakreditasi
2. 1 jurnal internasional
3. 3 jurnal pendukung

Tiga jurnal pendukung terdiri dari 1 jurnal nasional dan 2 jurnal internasional.

C. Isi Artikel

1. Artikel Pertama

Judul Artikel Pemisahan Delapan Vitamin Larut Air secara Kromatografi Pasangan Ion (KPI).

Nama Jurnal *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*

Penerbit JIFI

Vol. dan Hal. Vol. 7, No. 2, Hal. 85-90

Tahun Terbit 2009

Penulis Artikel Novi Yantih

Isi Artikel :

Tujuan Penelitian Untuk memperoleh kondisi optimum metode KPI guna pemisahan asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin dan menadion natrium bisulfit dalam campuran secara simultan.

Metode Penelitian :

- ✓ *Disain* Eksperimental
- ✓ *Populasi dan sampel*
 - a. Populasi : vitamin
 - b. Sampel : delapan vitamin larut air yaitu, asam askorbat (DSM, Singapura), tiamin hidroksida (BPFI), riboflavin (Roche Diagnostics GmbH), nikotinamida (Western Drugs Pvt. Ltd), piridoksin hidroklorida (DSM, Singapura), asam folat (DSM, Singapura), sianokobalamin (DSM, Singapura), menadion natrium bisulfit (DSM, Singapura).
- ✓ *Instrument* Kromatografi cair (HP 1100 QuatPump), kolom kromatografi C8 (LichroCARTR 250-4, LiChrospherR 100 Rp 8 (5µm), L 64044616, No. 516970), spektrofotometer ultraviolet (Beckman Du 650i), pH-meter (Beckman), dan alat-alat yang biasa digunakan di laboratorium kimia analisis.

Metode Analisis : a. Prosedur kerja :

1. Pembuatan larutan induk

Larutan baku induk tiamin hidroklorida, piridoksin hidroklorida, nikotinamida, dan menadion natrium bisulfit, masing-masing dibuat dengan konsentrasi 5,0; 1,0; 2,5 dan 2,0 mg/ml dalam asam asetat 1,0%. Larutan baku induk sianokobalamin disiapkan pada konsentrasi 5 µg/ml dalam asam asetat 1,0%. Larutan baku induk riboflavin dan asam folat dibuat dengan konsentrasi 1,0 dan 0,25 mg/ml dalam larutan natrium hidroksida 0,01 N. Asam askorbat langsung dilarutkan pada saat pembuatan larutan baku campuran vitamin.

2. Pembuatan larutan baku campuran

Larutan baku campuran vitamin dibuat dengan : Mencampurkan 1,0 ml larutan baku yang mengandung tiamin hidroklorida 5,0 mg/ml, piridoksin hidroklorida 1,0 mg /ml, dan menadion natrium bisulfit 2,0 mg/ml, ditambahkan 1,0 ml sianokobalamin 5 µg/ml serta 4,0 ml nikotinamida 2,5 mg/ml. Sebanyak 20,0

mg asam askorbat dilarutkan ke dalam campuran arutan tersebut, ditambahkan larutan natrium asetat 2,5 M hingga pH 4-5. Masukkan ke dalam larutan 2,0 ml larutan baku induk riboflavin 1,0 mg/ml dan asam folat 0,25 mg/ml, tambahkan larutan natrium hidroksida 0,01 N hingga volume 10,0 ml. Larutan baku vitamin dicampur homogen dan disaring dengan penyaring berpori 0,45 μm .

3. Pembuatan larutan baku kerja

Dipipet sebanyak 200 μl larutan baku campuran. Diencerkan dengan fase gerak yang mengandung natrium heksansulfonat 5 mM hingga 1,0 ml.

4. Pemilihan panjang gelombang deteksi pada daerah ultraviolet

Kondisi percobaan yang dioptimasi meliputi pemilihan panjang gelombang deteksi dan penentuan kondisi system KPI. Sejumlah tertentu larutan baku induk masing-masing vitamin diencerkan dengan fase gerak tanpa larutan natrium

heksansulfonat. Kemudian spektrum absorbansi masing-masing senyawa dibuat pada rentang panjang gelombang 100-400 nm. Seluruh spektrum absorbansi vitamin ditampilkan secara tumpang tindih (overlay) sehingga dapat menentukan panjang gelombang yang dapat digunakan untuk mendeteksi semua vitamin yang diuji.

5. Penentuan kondisi sistem KPI

Kolom oktilsilan dengan panjang 250 mm dan diameter 4 mm dikondisikan dengan fase gerak pada laju alir 1 ml per menit. Kemudian larutan baku kerja disuntikkan kedalam gerbang suntik kromatograf. Fase gerak yang digunakan adalah campuran methanol dan larutan natrium heksansulfonat 5 mM dalam asam asetat 1,0% yang telah diatur keasamannya hingga pH 2,80; 3,00 dan 5,50 dengan penambahan trietilamin. Larutan natrium heksansulfonat disaring dengan penyaring berpori 0,45 μm sebelum dimasukkan

kedalam wadah fase gerak. Perbandingan campuran methanol dan natrium heksansulfonat yang digunakan dicampur secara otomatis di dalam kromatograf dengan sistem isokratik. Fase gerak pH 3,50 telah menunjukkan hasil pemisahan yang baik sehingga dibuat juga fase gerak campuran methanol dan larutan natrium heksansulfonat 10 mM dalam larutan asam asetat 1,0% (pH 3,50) untuk melihat pengaruh konsentrasi larutan natrium heksansulfinat terhadap waktu retensi masing-masing vitamin, yaitu dengan membandingkan waktu retensi vitamin pada konsentrasi larutan natrium heksansulfonat 5 dan 10 mM. Pemisahan delapan vitamin pada laju alir fase gerak 1,5 ml per menit juga di amati.

6. Pembuatan kurva baku

Serbuk simulasi multivitamin dibuat dengan mencampur berturut-turut 200,0 mg asam askorbat; 60 mg tiamin hidroklorida; 24,0 mg riboflavin; 12,0 mg

piridoksin hidroklorida; 120,0 mg
nikotinamida; 10,0 µg sianokobalamin;
24,0 mg manedion natrium bisulfit dan
bahan pengisi hingga bobot 5 g. Sebanyak
± 1 g serbuk simulasi tersebut dimasukkan
ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian
didispersikan dalam 4 ml asam asetat 1,0
, dicampur homogen dan
disentrifugasi 30 putaran secara manual.
Supernatan didekantasi kedalam labu takar
25 ml. Prosedur tersebut diulang diulang
sebanyak 3 kali dan supernatant yang
diperoleh ditambahkan 0,5 ml natrium
asetat 2,5 M hingga pH 4-5 (larutan X).
Selanjutnya residu diendap-tuang dengan 3
kali 4 ml larutan natrium hidroksida 0,01 N,
dicampur homogen dan disentrifugasi 30
putaran secara manual. Supernatant
dipindahkan ke dalam labu takar yang
mengandung larutan X. Kedalam larutan X
ditambahkan larutan natrium hidroksida
0,01 N hingga 25 ml (pH 5). Larutan
disaring dengan penyaring membran

berpori 0,45 μm . Filtrate dipipet 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml dan 6,0 ml, kemudian masing-masing diencerkan hingga 10,0 ml dengan gase gerak tanpa larutan natrium heksansulfonat sehingga diperoleh 6 konsentrasi yang berbeda untuk masing-masing vitamin. Masing-masing larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20 μl ke dalam gerbang suntik kromatograf.

b. Analisa pengolahan data : SPSS

Hasil Penelitian : Parameter uji yang digunakan dalam jurnal ini terdiri dari 2 yaitu waktu retensi (tR) dan koefisien korelasi (r). Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan oleh analit dari awal kolom sampai ke detector, sedangkan linearitas merupakan kemampuan suatu metode analisa untuk menunjukkan hubungan secara langsung atau proporsional antara respons detektor dengan perubahan konsentrasi analit.

1. Waktu retensi

Waktu retensi asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, dan menadion natrium bisulfid tidak berbeda jauh dengan hasil yang

diperoleh pada pemisahan tujuh vitamin larut air dan puncak sianokobalamin muncul diantara puncak piridoksin hidroklorida dan riboflavin dengan waktu retensi sekitar 7,6 menit.

Waktu pemisahan delapan komponen vitamin yang efisien terjadi pada pH 3,50 dengan konsentrasi pereaksi pasangan ion 5 mM. Pada pH 3,50 puncak tiamin hidroklorida muncul sekitar akhir menit ke-10. Tiamin hidroklorida terionisasi dalam asam, sehingga jika pH semakin asam waktu retensi tiamin akan semakin besar. Pada pH 3,50 dengan konsentrasi pereaksi pasangan ion 5 mM menghasilkan waktu analisis yang relatif singkat (sekitar 12 menit) bila dibandingkan dengan konsentrasi pasangan ion yang lebih besar (10 mM, yaitu lebih dari 20 menit. Hal ini terjadi karena puncak tiamin baru muncul di menit ke-22 pada penggunaan konsentrasi 10 mM pereaksi pasangan ion. Dengan demikian, peningkatan konsentrasi pereaksi pasangan ion menyebabkan afinitas analit terhadap kolom menjadi lebih kuat. Sedangkan untuk hasil laju alir fase gerak

optimal, yaitu 1,0 ml/menit karena terjadi pemisahan yang baik untuk semua komponen vitamin.

2. Linearitas

Persamaan kurva baku delapan vitamin dalam serbuk simulasi multivitamin memperoleh dengan koefisien korelasi (r) masing-masing vitamin menunjukkan nilai mendekati 1. Nilai r yang diperoleh tersebut tidak terlalu berbeda dengan hasil yang telah dilakukan oleh Olivier Heudi (r lebih besar dari 0,995). Dengan metode yang digunakan, konsentrasi sianokobalamin lebih kecil dari 111,3 ng/ml) tidak terdeteksi, sehingga dihasilkan nilai koefisien korelasi yang lebih kecil dari 0,999. Hal ini menunjukkan, metode yang dikembangkan kurang sensitif untuk mendeteksi sianokobalamin karena panjang gelombang serapan maksimumnya ($\lambda_{\text{maks}} = 360 \text{ nm}$) jauh dari 275 nm.

3. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ)

Batas LOD : 0,1346 – 32,96

Batas LOQ : 0,4079 – 99,87

4. Uji kesesuaian sistem

Pada sistem KPI fase balik, proses pemisahan serbuk campuran asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit yang optimum diperoleh pada penggunaan kolom oktilsilan dengan panjang 250 mm dan diameter 4 mm, fase gerak pada laju alir 1 ml/menit yang terdiri dari campuran metanol dan larutan natrium heksansulfonat 5 mM dalam asam asetat 1% yang telah diatur keasamannya hingga pH 3,50 dengan penambahan trietilamin (49:151), volume injeksi 20 μ l, dan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 275 nm. Metode KPI pada kondisi tersebut mampu menentukan masing-masing komponen vitamin dalam campuran secara selektif. Pada kondisi tersebut semua analit yang diuji dapat terpisah dengan baik dengan faktor resolusi lebih besar 1,5, yaitu antara 3,8-10,6 dalam waktu sekitar 12 menit dengan waktu retensi masing-masing vitamin

yang tidak berbeda, antara bentuk tunggal dan dalam bentuk campuran.

Kesimpulan dan saran : Campuran vitamin asam askorbat, tiamin hidroklorida, riboflavin, nikotinamida, piridoksin hidroklorida, asam folat, sianokobalamin, dan menadion natrium bisulfit dapat dipisahkan secara selektif dengan nilai resolusi lebih besar dari 1,5, yaitu antara 3,8-10,6 dalam waktu sekitar 12 menit pada sistem KPI fase balik dengan kolom oktilsilan dengan panjang 250 mm dan diameter 4 mm, fase gerak pada jalur alir 1,0 ml/menit yang terdiri dari campuran methanol dan larutan natrium heksansulfonat 5 mM dalam asam asetat 1% dan telah diatur keasamannya hingga pH 3,50 dengan penambahan trietilamin (49:151), volume injeksi 20 μ l dan detector ultraviolet pada panjang gelombang 275 nm.

2. Artikel Kedua

Judul Artikel

A Novel RP-HPLC Method For Simultaneous Determination Of Vitamins B1, B2, B3, B6 and C In Oral Powder For Veterinary Consumption.

XDB C18 dengan dimensi 250 mm x 4,6 mm dan ukuran partikel 5 μ m.

Metode Analisis : a. Prosedur kerja :

1. Standar

Semua standar yang digunakan dalam validasi disediakan oleh Produk Gizi DSM dan digunakan tanpa pemurnian lebih lanjut. Vitamin B1, vitamin B2, vitamin B3, vitamin B6 dan vitamin C standar kemurnian kerja masing-masing adalah 100,3%, 72,2%, 99,8%, 100,2%, dan 99,7%.

2. Persiapan fase gerak

Fase gerak A : 1,86 g asam 1-heksanesulfonat-natrium dilarutkan ke dalam 1 liter air suling, kemudian ditambahkan 15 ml asam asetat campur hingga homogeny.

Fase gerak B : mencampurkan metanol dan fasa gerak A dalam perbandingan (90:10 V / V), dilewatkan melalui filter membran 0,45 μ m dan diturunkan selama 10 menit dengan sonikasi.

3. Persiapan larutan :

- a. Persiapan stok larutan standar vitamin C dan vitamin B3.

30 mg larutan standar vitamin C dan 45 mg larutan standar B3 ditimbang dan dimasukkan dalam 20 mL labu ukur. Tambahkan 10 mL air suling, disonikasi selama 2 menit dan diencerkan dengan volume air suling (CVitamin C = 1,5 mg/mL, CVitamin B3 = 2,25 mg/mL).

- b. Persiapan stok larutan standar vitamin B1, B2 dan vitamin B6.

Ditimbang 30 mg standar vitamin B1, 15 mg vitamin B6 dan 37,5 mg vitamin B2 masukkan dalam labu ukur 50 mL. Tambahkan 25 mL air suling, disonikasi selama 2 menit dan diencerkan dengan volume air suling (CVitamin B1 = 0,60 mg/mL, CVitamin B2 = 0,75 mg/mL, CVitamin B6 = 0,30 mg/mL).

- c. Persiapan larutan standar

Sebanyak 4,0 mL stok larutan standar vitamin C, stok vitamin B3 dan 2,0 mL stok larutan standar vitamin B1, B2, B6, dipindahkan ke dalam labu ukur 20 mL. diencerkan kedalam fase gerak A dan disaring melalui filter 0,45 μ m RC (CVitamin B3 = 0,45 mg/mL, CVitamin C = 0,30 mg/mL, CVitamin B1 = 0,06 mg/mL, CVitamin B2 = 0,075mg/mL, CVitamin B6 = 0,03 mg/mL).

d. Persiapan larutan sampel

2,5 g sampel ditimbang, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan 50 mL air suling, vorteks selama 2 menit, disonikasi selama 2 menit, kemudian diencerkan dengan air suling. Sebanyak 3,0 mL dipindahkan ke dalam labu volumetrik 25 mL, diencerkan dengan fase gerak A dan disaring melalui filter 0,45 μ m RC (CVitamin B3 = 0,45 mg/mL,

CVitamin C = 0,30 mg/mL,

CVitamin B1 = 0,06 mg/mL,

CVitamin B2 = 0,075mg/mL,

CVitamin B6 = 0,03 mg/mL).

e. Persiapan larutan placebo

Sebanyak 1.738 g plasebo (tanpa vitamin B1, B2, B3, B6 dan vitamin C), ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. ditambahkan 50 mL air suling, vorteks selama 2 menit, disonikasi selama 2 menit. Sebanyak 3,0 mL dipindahkan ke dalam labu volumetrik 25 mL, diencerkan dengan fase gerak A dan disaring melalui filter 0,45 μm RC.

4. Uji kesesuaian sistem

Pemisahan dicapai dengan menggunakan kolom Zorbax XDB C18 dengan dimensi 250 mm x 4,6 mm dan ukuran partikel 5 μm . Laju aliran dipertahankan sebagai 1,3 mL/menit dan dipantau pada 270 nm dengan suhu sekitar. Pemisahan dan

kuantifikasi yang efektif diperoleh dalam 30 menit dengan 10 μ l volume injeksi. Suhu otomatis dijaga 5°C dan elusi gradien.

b. Analisa pengolahan data : Exceel

Hasil Penelitian : Terdapat enam parameter uji yang dilakukan dalam penelitian ini, yaitu specificity (selektivitas), linearitas, akurasi, presisi dan presisi menengah, Robustness (kekuatan/ketahanan), dan stabilitas.

1. Kesesuaian Sistem

Asam asetat dalam fase gerak berkontribusi sangat besar untuk mencapai bentuk puncak yang lebih baik dengan factor tailing mulai dari 0,8-1,5. Fase gerak pada metode gradien yang diotimalkan meningkatkan waktu retensi vitamin yang bersifat polar dengan nilai resolusi signifikan menghasilkan puncak yang tajam dan simetris. Fase gerak A dan air suling digunakan sebagai pengencer. Deteksi dilakukan dalam kisaran 200 nm hingga 800 nm menggunakan detektor *array fotodioda* dan ditetapkan pada 270 nm, dimana

parameter kesesuaian sistem dan area vitamin yang dianalisis secara statistik signifikan.

2. Selektivitas (*Specificity*)

Dari hasil penelitian kelima sampel yaitu vitamin B1, B2, B3, B6 dan vitamin C memperoleh nilai factor resolusi lebih dari 1.

3. Linearitas

Pada uji linearitas, pengujian dilakukan terhadap lima larutan vitamin yang berbeda yaitu B1, B2, B3, B6 dan vitamin C pada konsentrasi 80%, 90%, 100%, 100% dan 120%.

Hasil yang diperoleh dengan metode KCKT, kelima vitamin tersebut memiliki nilai regresi yang baik yaitu lebih dari 0,999.

4. Akurasi

Syarat recovery menurut pedoman ICH adalah 98-102, dilihat dari nilai minimum dan maksimum nilai recovery.

Konsentrasi akurasi yang representative yang dilakukan dalam penelitian yaitu pada tingkat konsentrasi 80%, 100% dan 120% berada pada kisaran 98,10-101,87. Hal ini menyatakan

bahwa nilai recovery sampel sesuai dengan pedoman ICH.

5. Presisi dan presisi menengah

Analisis presisi dan presisi antara dilakukan pada penelitian ini pada dua hari yang berbeda dengan dua KCKT, kolom, dan analisis yang berbeda. Data yang diperoleh dari presisi maupun presisi antara, nilai RSD semua vitamin kurang dari 2%.

6. Ketahanan/kekuatan (*Robustness*).

Studi ketahanan yang dilakukan dalam beberapa variasi disengaja untuk mengamati efek pada metode yang diusulkan, yaitu temperatur, laju aliran, panjang gelombang, dan perubahan jumlah lot kolom. Data yang diperoleh dari analisa mengatakan bahwa hasil yang diperoleh memuaskan karena sesuai dengan European Pharmacopeia (Eur. Ph) dan United States Pharmacopeia (USP).

7. Stabilitas larutan

Stabilitas larutan dilakukan selama 48 jam. Standar dan sampel ditemukan stabil selama 19 jam.

Laju aliran dipertahankan 1,3 mL/menit dan dipantau pada 270 nm dengan suhu sekitar. Pemisahan dan kuantifikasi yang efektif diperoleh dalam 30 menit dengan volume injeksi 10 µl. Metode gradien fase balik menghasilkan resolusi yang signifikan antara vitamin yang tertarik dan matriks plasebo. Pengembangan metode analitis, diikuti oleh validasi metode analitik dilakukan sesuai dengan pedoman Konferensi Internasional Harmonisasi (ICH). Evaluasi statistik dari parameter validasi membuktikan bahwa hasilnya sangat spesifik, tepat, akurat, kuat dan linier pada rentang konsentrasi yang luas. Metode ini telah divalidasi dan terbukti dapat diterapkan dalam analisis rutin vitamin B1, vitamin B2, vitamin B3, vitamin B6 dan vitamin C dalam bubuk oral untuk konsumsi hewan.

Kesimpulan dan saran : Metode ini spesifik, tepat, akurat, kuat dan linier sesuai dengan pedoman ICH, European Pharmacopein dan USP. Vitamin dalam penelitian ini terpisah satu sama lain dengan resolusi signifikan minimal yaitu 3,2. Selain itu, vitamin

dalam penelitian ini tidak mengganggu matriks plasebo.

3. Artikel Ketiga

Judul Artikel Perbandingan Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Eluasi Gradient Dengan Isokratik Pada Penentuan Vitamin B1, B2, dan B6 Dalam Sediaan Sirup Multivitamin Secara Simultan.

Nama Jurnal Indonesian E-Journal Of Applied Chemistry.

Penerbit Cakra Kimia.

Vol. dan Hal. Vol. 3 (1) : 1-8

Tahun Terbit 2015

Penulis Artikel Ni Luh Kasih Ariani, Ni Made Suaniti, James Sibarani.

Isi Artikel :

Tujuan Penelitian Tujuan penelitian ini adalah membandingkan analisis vitamin B1, B2, dan B6 dalam sirup multivitamin secara simultan dengan kromatografi cair kinerja tinggi eluasi gradien dan isokratik, menggunakan kolom C18, panjang 15 cm, dan dengan pelarut campuran methanol : air : asam asetat glasial (10:90:1).

Metode Penelitian :

- ✓ *Disain* Eksperimental
- ✓ *Populasi dan sampel*
 - a. Populasi : vitamin
 - b. Sampel : tiga vitamin larut air yang terdapat dalam sirup multivitamin yaitu, vitamin B1, B2 dan B6.
- ✓ *Instrument* Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Shimadzu 20-AD, dengan Kolom C18 (3.9 x 150 mm) merk Phenomenex dengan ukuran partikel 10 µm.

Metode Analisis Prosedur penelitian :

- :
 - a. Metode :
 1. Pelarut yang digunakan :
Campuran Air : Metanol : Asam asetat glasial (90:10:1)
 2. Fase gerak :
Campuran larutan natrium heksan sulfonat 5 mM dalam asam asetat glasial 0,5% dengan metanol p.a.
 3. Larutan baku induk :
Tiamin HCl, riboflavin HCl, dan piridoksin HCl dibuat berturut-turut dengan konsentrasi 0,5; 0,075; 0,1 mg/mL.
 4. Larutan baku campuran :

Dipipet masing-masing 4,0 mL larutan baku induk Tiamin HCl, 20,0 mL, Riboflavin HCl, dan 4,0 mL Piridoksin HCl. Dicampur dalam labu 50 ml, dikocok hingga homogen. Disaring menggunakan *syringe filter* 0,45 μm . Larutan sampel simulasi Tiamin, Piridoksin dan Riboflavin berturut-turut adalah 80%, 100% dan 120%. Dihomogenkan dengan ultrasonikator selama 20 menit pada suhu 60-75 °C.

5. Uji kesesuaian sistem

b. Validasi metode analisis

1. Reliabilitas

Sebanyak 20 μL larutan baku disuntikkan 6 kali, dihitung Relative Standard Deviation (RSD) atau simpangan baku relatif area dan RSD waktu retensi masing-masing komponen vitamin. Analisis dapat dilanjutkan jika nilai RSD lebih kecil dari 2 %.

2. Selektifitas

Larutan baku campuran disuntikkan ke dalam alat KCKT kemudian kromatogram larutan dibandingkan dengan kromatogram larutan pada percobaan uji kesesuaian sistem kromatografi.

3. Kelinearan

Dibuat satu seri larutan: 70%, 80%, 90%, 100%, 110% dan 120% dari kadar analit. Masing-masing larutan diinjeksikan ke dalam kolom KCKT sebanyak 20 µl dan diulang tiga kali.

4. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ)

LOD dan LOQ dihitung menggunakan rumus Miller. Kecermatan dihitung persen perolehan kembali atau *Spiked-placebo recovery* method. Keseksamaan dihitung berdasarkan RSD dengan syarat lebih kecil dari 2%.

Analisa pengolahan data : SPSS

Hasil Penelitian: Terdapat tiga parameter uji yang digunakan dalam validasi metode KCKT Gradien, yaitu uji linearitas, akurasi dan presisi.

1. Uji kesesuaian sistem

Panjang gelombang maksimal pada KCKT dengan detector *Photo Diode Array* (PDA) sebagai identifikasi awal memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 280 nm. Panjang kolom yang digunakan pada optimasi metode ada 2 yaitu 150 mm dan 250 mm. Kolom 250 m, diperoleh hasil dengan waktu retensi piridoksin 4,328 menit, riboflavin 9,799 menit, dan tiamin 12,540 menit. Sedangkan kolom 150 mm dengan waktu retensi berturut-turut 3,441; 4,985 dan 7,393 menit. Untuk variasi laju alir yaitu 1,0; 1,5; dan 2,0 ml/menit dengan hasil pemisahan paling cepat pada laju alir 2,0 ml/menit dengan resolusi 2,272 pada eluasi gradien dan 2,222 pada eluasi isokratik. Resolusi yang diperoleh lebih besar dari 1,5 maka dapat dikatakan analit terpisah dengan baik. Uji parameter Kesesuaian Sistem (UKS) sebagai % Relatif Standard Deviasi (RSD) yang diperoleh pada analisis baik peak area maupun terhadap waktu retensi pada tiamin HCl, riboflavin HCl, dan piridoksin HCl menggunakan KCKT sebesar

0,274- 0,713%. Hal ini sesuai bahwa sistem dan prosedur dengan instrumen KCKT mampu memberikan hasil yang dapat diterima dengan $\%RSD < 2\%$.

2. Koefisien kolerasi (r)

Penelitian ini menggunakan 2 metode yaitu gradient dan isokratik.

- a. Nilai koefisien korelasi dari KCKT gradient adalah $\geq 0,999$, dimana persamaan kurva baku riboflavin adalah $y = 42,453 x + 81072,80$ dan nilai $r^2 = 0,9996$; tiamin adalah $y = 12,83 x - 9804,82$ dengan nilai $r^2 = 0,9995$; sedangkan untuk piridoksin $y = 23,89 x + 420,29$ dengan $r^2 = 0,9994$, sehingga dapat dikatakan bahwa kurva baku ketiga vitamin tersebut linier.
- b. Kurva linearitas riboflavin, piridoksin, dan tiamin menggunakan metode isokratik. Persamaan kurva baku untuk riboflavin adalah $y = 25951,23 x + 43050,46$ dengan nilai $r^2 = 0,9999$, sedangkan persamaan kurva baku untuk piridoksin adalah $y = 31627,91 x + 87988,76$ dan nilai $r^2 = 0,9999$.

Berdasarkan nilai r hasil analisis maka kurva kalibrasi pada kedua metode dapat dikatakan linier, karena nilai r lebih dari 0,999.

3. Presisi

Uji presisi ketiga jenis vitamin, hasil perbandingan dari metode gradient maupun isokratik memenuhi syarat yaitu RSD bernilai lebih kecil dari 2 %, dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa metode tersebut mempunyai ketelitian yang baik.

4. Akurasi

Ada 3 level kadar yang ditetapkan pada penelitian ini yaitu 80%, 100% dan 120%. Replikasi untuk masingmasing level dilakukan sebanyak 3 kali. Pengujian dilakukan secara *spiked-placebo recovery method* yaitu dengan menambahkan analit pada matriks yang diketahui komposisinya.

Hasil perolehan kembali analit dari uji akurasi memenuhi persyaratan karena nilai rerata kadar masih berada dalam rentang yang dipersyaratkan yaitu 99,23-100,90.

Perbandingan metode isokratik dan metode gradient :

Parameter uji yang dibandingkan adalah jumlah analit yang dapat dideteksi, waktu retensi, presisi, linearitas dan resolusi. Identifikasi awal menggunakan sampel, puncak tiamin pada sampel tidak terdeteksi dengan baik secara isokratik sehingga untuk selanjutnya analisis hanya dilakukan terhadap riboflavin dan piridoksin. Dengan menggunakan kolom, alat KCKT, laju alir yang sama diperoleh waktu retensi yang lebih pendek untuk metode KCKT gradien. Resolusi untuk metode gradien sebesar 2,272 sedangkan metode isokratik sebesar 2,222. Kedua metode memberikan hasil pemisahan yang baik dengan resolusi di atas 1,5 sesuai yang dipersyaratkan. Keempat parameter yaitu waktu retensi, resolusi, uji linearitas dan uji presisi, hanya waktu retensi dan uji presisi diperoleh hasil yang lebih baik menggunakan metode gradien. Resolusi antara dua senyawa memenuhi persyaratan analitik $>1,5$.

Kesimpulan dan saran : Metode KCKT gradien hasil optimasi pada penelitian ini dapat digunakan untuk analisis tiamin, riboflavin dan piridoksin pada sampel sediaan sirup multivitamin yang beredar di pasaran sedangkan metode isokratik hanya memisahkan riboflavin dan

piridoksin. Metode KCKT gradien hasil pengembangan dari metode isokratik tersebut memberikan hasil analisis yang lebih optimal dilihat dari parameter waktu retensi, daya pisah dan uji presisi. Hasil uji presisi riboflavin dan piridoksin menggunakan metode isokratik masing-masing dengan RSD adalah 1,377 dan 1,376.

4. Artikel Keempat

Judul Artikel Chromatographic Analysis of Vitamin B1, B2, B6 and Folic Acid in Multivitamin Pharmaceutical Dosages Available in Local Market.

Nama Jurnal *International Journal of Chemical Engineering and Applications.*

Penerbit Hindawi

Vol. dan Hal. Vol. 9, No. 4, 139-142

Tahun Terbit 2018

Penulis Artikel Syeda Kiran Shahzadi, Muhammad Abdul Qadir, and Adil Munir.

Isi Artikel :

Tujuan Untuk menganalisis beberapa vitamin dalam bentuk

Penelitian sediaan farmasi multivitamin dengan menggunakan teknik KCKT.

Metode Penelitian :

- ✓ *Disain* Eksperimental
- ✓ *Populasi dan sampel*
 - a. Populasi : vitamin
 - b. Sampel : vitamin larut air yaitu enam tablet multivitamin dan kapsul dipilih secara acak dan dikumpulkan dari pasar lokal Lahore, Pakistan.
- ✓ *Instrument* Sistem Shimadzu LC (pompa LC 20A), detektor UV / Visible panjang gelombang 254 nm. Kolom HPLC C18 suhu 35 °C.

Metode a. Prosedur kerja :

Analisis:

1. Pengambilan sampel
Tablet dan kapsul multivitamin yang digunakan dalam analisis dikumpulkan secara local dari Lahore, Pakistan.
2. Persiapan standar
1 mg/ml standar yaitu tiamin klorida hidroklorida, riboflavin, piroksin hidroklorida dan asam folat, dilarutkan dalam methanol. Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan tiamin hidroklorida konsentrasi 5-10 µg/ml, riboflavin 1,5-2 µg/ml, piridoksin hidroklorida 5-10 µg/ml

dan asam folat 1-2 $\mu\text{g/ml}$. Masing-masing larutan digunakan untuk analisis.

3. Persiapan sampel

Setiap tablet di timbang dan digerus halus. Sampel bubuk di suspensikan dalam 50 ml methanol. Di sonikasi selama 15 menit dan diencerkan hingga 100 ml dengan methanol. Di ambil 50 μl masing-masing untuk di analisis secara HPLC.

4. Kondisi kromatografi

Sistem Shimadzu LC (pompa LC 20A) yang dilengkapi dengan detektor UV / Visible untuk analisis. Panjang gelombang tunggal 254 nm digunakan untuk deteksi simultan. Kolom HPLC C18 digunakan pada suhu 35 °C. Metanol - 0,05 M natrium asam fosfat (80 + 20, v / v) pada pH 7,0 digunakan sebagai fase gerak. Laju aliran disesuaikan menjadi 0,8 ml/menit. 50 μl sampel dan larutan standar disuntikkan dalam satu injeksi.

b. Analisa pengolahan data : Excell

Hasil

Hasil validasi metode, yaitu :

Penelitian:

1. Uji kesesuaian sistem :

Untuk pemisahan dan kuantifikasi vitamin dalam formulasi multivitamin, hasil terbaik diperoleh dengan metanol - 0,05 M natrium asam fosfat (80 + 20, v / v) sebagai fase gerak. Pengaruh parameter minor seperti komposisi eluen, nilai pH, laju aliran dan suhu diselidiki. Ada yang diamati efek minor atau tidak ada parameter ini pada hasil analitis. Komposisi fase gerak diubah menjadi $\pm 5\%$, suhu kolom dari 25 hingga 40 ° C dan pH dari 5 hingga 8. Tidak ada efek yang luar biasa pada waktu retensi. Perubahan kecil ini tidak ikut campur dalam hasil kuantifikasi juga, sehingga analisis dilakukan dengan metanol - 0,05 M natrium asam.

2. Waktu retensi

Nilai waktu retensi dari jurnal ini yang diperoleh adalah 3,205 menit untuk vitamin B1, 2,9511 menit untuk vitamin B2, 2,801 menit untuk vitamin B6 dan 4,189 menit untuk asam folat.

3. Linearitas

Kurva linear yang diperoleh dengan kisaran konsentrasi standar kerja 5-10 $\mu\text{g/mL}$ untuk vitamin B1 dan B6, 1,5-2 $\mu\text{g/mL}$ untuk vitamin B2 dan 1-2 $\mu\text{g/mL}$ untuk asam folat. Nilai koefisien korelasi yang diperoleh berada di atas 0,99.

4. Nilai recovery

Data perolehan kembali (recovery) dari vitamin B1, B2, B6 dan asam folat yaitu 98,2-100,98.

5. Range

Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Dari data yang diperoleh rentangnya berkisar antara 95-105.

6. RSD

Nilai %RSD untuk vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6 dan asam folat dalam larutan sampel berada dalam kisaran 0,04 hingga 1,8 (di bawah 2%) yang menunjukkan pengulangan yang memuaskan dari sistem analitik.

Kesimpulan dan Saran : Jumlah dan kadar vitamin dalam semua formulasi sama dengan yang tercantum pada label pada kemasan. Nilai RSD untuk vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6 dan asam folat dalam larutan sampel berada dalam kisaran 0,04 hingga 1,8 (di bawah 2%) yang menunjukkan pengulangan yang memuaskan dari sistem analitik. Persentase recovery vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6 dan asam folat berada dalam batas (95-105%) menunjukkan validitas dan akurasi metode.

5. Artikel Kelima

Judul Artikel Formulation, Method Development and Validation of Water Soluble Vitamins B1, B2 and B6 in Bulk Tablet Dosage Form by HPTLC Method.

Nama Jurnal *Journal of Pharmaceutical Chemistry.*

Penerbit Vensel

Vol. dan Hal. Vol. 5 (1), 1-4

Tahun Terbit 2018

Penulis Artikel Devi Velmurugan, Jambulingan Munusamy, Ananda Thangadurai Subramaniam, Anandakumar Karunakaran, Abdul Latiff MKM, Kamalakannan Dhanapal.

Isi Artikel :

Tujuan Penelitian Pengembangan metode dan validasi vitamin B yang larut air B1, B2 dan B6 dalam bentuk sediaan curah dan tablet dengan metode KLTKT.

Metode Penelitian :

- ✓ *Disain* Eksperimental
- ✓ *Populasi dan sampel*
 - a. Populasi : vitamin
 - b. Sampel : vitamin larut air yaitu, Larutan standar B1 (tiamin hidroklorida), B2 (riboflavin) dan B6 (piridoksin) sebagai sampel diperoleh dari Saimirra Innopharm Pvt Ltd, Chennai, Tamilnadu, India.
- ✓ *Instrument* UV Spectrophotometer (Perkin Elmer), akuisisi data dilakukan dengan perangkat lunak Lambda 25. Pemisahan kromatografi dicapai pada ruang camag twin trough glass (20x10 cm) dan akuisisi data dilakukan dengan perangkat lunak Wincat.

Metode Analisis a. Prosedur kerja

:

1. Persiapan granul
 - Setiap tablet mengandung 250 mg vitamin B1, 40 mg vitamin B2, dan 50 mg vitamin B6, dibuat dengan teknik granulasi basah dan total berat sekitar 500 mg.

2. Prosedur pelepasan

Laju pelepasan tablet yang diformulasi ditentukan dengan menggunakan alat uji disolusi USP tipe II (tipe paddle). Uji disolusi dilakukan dengan menggunakan 900 mL HCL 0,1 N pada 50 rpm selama 1 jam pada suhu sekitar. Aliquot 10 mL ditarik untuk setiap lima menit selama periode 1 jam. Sampel disaring melalui kertas whatman filter (no. 45), sebanyak 4 ml filtrat dan dianalisis pada panjang gelombang masing-masing. Jumlah obat yang dilepaskan dihitung dari data kumulatif.

3. Metode HPLC

a. Penentuan titik isobestik

Untuk menentukan titik isobestik larutan B1, B2 dan B6 pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$, masing-masing antara 200 dan 800 nm.

b. Kondisi kromatografi

Pemisahan kromatografi dilakukan pada pelat aluminium 10x10 cm yang telah dilapisi dengan 100 μm lapisan silica gel

60F₂₅₄. Pelat KLT yang sudah dicuci sebelumnya dengan methanol, diaktifkan pada suhu 80°C selama 5 menit sebelum menerapkan sampel. Pelat KLT diaplikasikan dengan sampel menyisakan 15 mm dari tepi bawah menggunakan Linomat V, aplikator semi-otomatis. Pelat KLT kemudian dikembangkan dalam ruang bak kembar menggunakan asetonitril : air dalam perbandingan 6:4 v/v sebagai fase gerak. Dipindai menggunakan pemindai KLT IV dengan kecepatan 20 mm/detik dan deteksi panjang gelombang 280 nm perangkat lunak win-CATS digunakan untuk akuisisi dan analisis data.

4. Metode pengujian

a. Persiapan standar

Sebanyak 25 mg vitamin B1, B2 dan B6 ditimbang dan dilarutkan dalam 5 mL NaOH dan 20 mL methanol, kemudian disonikasi selama 25 menit dan disaring

melalui 0,45 μm filter nilon. Filtrat digunakan untuk untuk pengujian.

b. Persiapan sampel

Dua puluh tablet yang diformulasikan ditimbang dan di triturasi. Serbuk setara dengan 250 mg diambil dan dilarutkan dalam 5 mL NaOH dan 45 mL methanol, kemudian disonikasi selama 25 menit dan disaring melalui 0,45 μm filter nilon.

Analisa pengolahan data : Excell

Hasil

1. Kondisi kromatografi

Penelitian:

Pemisahan yang dilakukan menggunakan fase gerak asetonitril : air (6:4 v/v) yang dijenuhkan selama 30 menit dan deteksi UV dilakukan pada panjang gelombang 280 nm, dengan nilai r_f yang diperoleh masing-masing vitamin adalah 0,27, 0,44 dan 0,63.

2. Linearitas

Vitamin B1, B2 dan B6 dalam studi linearitas ditemukan dalam kisaran konsentrasi 0,5-3,0 $\mu\text{g/mL}$, diamati dari masing-masing kurva kalibrasi dengan koefisien korelasi 0,9990.

3. Akurasi

Keakuratan metode yang diusulkan ditentukan oleh penambahan standar pada tiga level yaitu 80%, 100% dan 120%. Nilai %RDS semua vitamin yang di analisis kurang dari 2. Hal ini menunjukkan bahwa tidak adanya gangguan pada eksipien yang digunakan dalam formulasi.

4. Presisi

Uji presisi untuk vitamin B1, B2 dan B6 dilakukan dalam satu hari dengan lima ulangan injeksi pada konsentrasi 2,0 µg/mL. Dalam studi presisi ditemukan bahwa nilai %RDS yang diperoleh kurang dari 2%.

5. Batas deteksi / *Limit of detection* (LOD) dan batas kuantitas / *limit of quantification* (LOQ).

Pendekatan yang didasarkan pada standar deviasi nilai intersep dan kemiringan grafik kalibrasi digunakan untuk menentukan batas deteksi ($3.3 \sigma/S$) dan batas kuantifikasi ($10 \sigma/S$).

Batas deteksi yang ditemukan dari vitamin B1, B2 dan B6 masing-masing adalah 3,750278 µg/mL, 3,744794 µg/mL dan 3,775815 µg/mL dengan LOD yang dihitung $3.3 \sigma/S$. batas kuantifikasi ditemukan 11,36448 µg/mL, 11,34786 µg/mL dan 11,44186

$\mu\text{g/mL}$ untuk vitamin B1, B2 dan B6 dengan LOQ yang dihitung sebesar $10 \sigma/S$.

Kesimpulan dan Saran : Metode KLTKT yang sederhana, tepat dan akurat dikembangkan untuk memperkirakan vitamin B yang larut dalam air B1, B2, dan B6 dalam kombinasi dosis tetap dari tablet yang diformulasikan. Metode ini divalidasi untuk melihat linearitas, presisi, akurasi dan LOD serta LOQ. Metode ini dinyatakan sederhana dan akurat jika dibandingkan dengan metode lain.