

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR VIT B2 DAN  
VIT B6 MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI DAN APLIKASINYA PADA MINUMAN SARI BUAH  
APEL**

**SKRIPSI**



oleh:

Abdul Muiz Addairobi

155010179

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS WAHID HASYIM  
SEMARANG  
Agustus 2020**

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR VIT B2 DAN  
VIT B6 MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI DAN APLIKASINYA PADA MINUMAN SARI BUAH  
APEL**

**SKRIPSI**

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat  
dalam mencapai derajat Sarjana Farmasi  
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Wahid Hasyim**

oleh:

Abdul Muiz Addairobi

155010179

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS WAHID HASYIM  
SEMARANG  
Agustus 2020**

## INTISARI

### **VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR VIT B2 DAN VIT B6 MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DAN APLIKASINYA PADA MINUMAN SARI BUAH APEL**

Vitamin B2 dan vitamin B6 merupakan nutrisi yang penting bagi kesehatan yang terkandung dalam buah apel. Konsumsi harian vitamin B2 adalah 50 mg/hari dan vitamin B6 adalah 100 mg/hari. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui banyaknya kandungan vitamin B2 dan B6 dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) serta mengaplikasikannya dalam minuman sari buah apel.

Penetapan kadar vitamin B2 dan B6 menggunakan alat KCKT tipe Jasco yang dilengkapi dengan detektor UV- Vis pada panjang gelombang 280 nm. Fase gerak yang digunakan yaitu metanol: air: asam asetatglasial dengan perbandingan 20: 80: 1 dan fase diam menggunakan  $C_{18}$  dengan laju alir 1ml/menit. Uji validasi yang dilakukan pada penelitian ini meliputi selektivitas, linieritas, presisi, akurasi, dan sensitivitas.

Hasil penelitian menunjukkan metode penetapan kadar telah memenuhi syarat parameter validasi yaitu didapatkan selektivitas yang baik, linieritas dengan nilai korelasi ( $r$ ) = 0,998, uji presisi %RSD vitamin B2 sebesar 0,765% dan %RSD vitamin B6 sebesar 0,659% , akurasi dengan perolehan kembali vitamin B2 99,364 -99,877% dan perolehan kembali vitamin B6 99,338-101,444%, nilai LOD & LOQ vitamin B2 sebesar 0,065 & 0,217 dan nilai LOD &LOQ vitamin B6 0,188 & 0,627. Metode memenuhi syarat validasi dan dapat diaplikasikan pada penetapan kadar vitamin B2 dan B6 dalam sediaan minuman sari buah apel.

Kata kunci: Vitamin B2, Vitamin B6, KCKT,Validasi

## **ABSTRACT**

### **VALIDATION METHOD FOR DETERMINING VIT B2 AND VIT B6 LEVELS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND ITS APPLICATION IN THE DRINK OF APEL FRUIT**

Vitamin B2 and vitamin B6 are essential nutrients for health contained in apples. Daily consumption of vitamin B2 is 50 mg / day and vitamin B6 is 100 mg / day . The purpose of this study was to determine the amount of vitamin B2 and B6 content with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and to apply it in apple cider drinks.

Determination of vitamin B2 and B6 levels using Jasco HPLC equipment equipped with a UV-Vis detector at a wavelength of 280 nm. The mobile phase used is methanol: water: acetatglacial acid with a ratio of 20: 80: 1 and a stationary phase using C<sub>18</sub> with a flow rate of 1ml / minute. Validation tests conducted in this study include selectivity, linearity, precision, accuracy, and sensitivity.

The results showed that the method of determining the levels had met the validation parameter requirements which were obtained good selectivity, linearity with a correlation value ( $r$ ) = 0.998, the precision test of % RSD vitamin B2 of 0.765% and % RSD of vitamin B6 of 0.659%, accuracy with vitamin recovery B2 99,364 -99,877% and recovery of vitamin B6 99,338-101,444%, vitamin B2 LOD & LOQ values in 0.065 & 0.217 and vitamin B6 LOD & LOQ values 0.188 & 0.627 The method meets the validation requirements and can be applied to the determination of vitamin B2 and B6 LOD values in 0.065 & 0.217 and vitamin B6 LOD & LOQ values 0.188 & 0.627. The method meets the validation requirements and can be applied to the determination of vitamin B2 and B6 levels in the preparation of 0.065 & 0.217. Apple cider drinks.

**Keywords:** Vitamin B2, Vitamin B6, HPLC, Validation

## **PENGESAHAN SKRIPSI**

**Berjudul**

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR VIT B2 DAN  
VIT B6 MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI  
DAN APLIKASINYA PADA MINUMAN SARI BUAH APEL**

oleh:  
Abdul Muiz Addairobi  
155010179

**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim  
Pada tanggal: 8 Agustus 2020**

**Pembimbing**

(apt. Aqnes Budiarti, M.Sc.)

**Mengetahui**

**Fakultas Farmasi**

**Universitas Wahid Hasyim**

**Dekan,**



(apt. Aqnes Budiarti, M.Sc.)

**SURAT PERNYATAAN**

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Abdul Muiz Addairobi

NIM : 155010179

Judul Skripsi : Validasi Metode Penetapan Kadar Vit B2 dan Vit B6  
Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan  
Aplikasinya Pada Minuman Sari Buah Apel

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis digunakan sebagai acuan dalam naskah dan disebutkan dalam pustaka.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya dan dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 10 Agustus 2020



Abdul Muiz Addairobi

Hiduplah Seperti Bunga Teratai, Bunga Yang Dapat Hidup Pada Berbagai Air.

“Sebaik-baik manusia adalah orang yang paling bermanfaat bagi manusia lainnya”

Ku persembahkan kepada:  
Bapak dan Ibuku tercinta senantiasa mendo'akan ku setulus hati,  
selalu memberi dukungan dan semangat sepanjang masa  
Kakakku tersayang yang telah mendo'akan dan menyemangatiku  
Serta almamaterku sebagai wujud terima kasih dan khidmahku

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Validasi Metode Penetapan Kadar Vit B2 dan Vit B6 Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Aplikasinya Pada Minuman Sari Buah Apel”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam memperoleh derajat Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.

Penulis menyadari bahwa penelitian skripsi ini terdapat banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna. Dalam penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Untuk itu penulis ingin mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu apt. Aqnes Budiarti, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang sekaligus dosen pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan skripsi ini.
2. Dosen Penguji yang bersedia meluangkan waktu dan memberikan saran, masukan dan koreksi terhadap skripsi ini.
3. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan sebagai dasar penulisan skripsi ini.



4. Kepala dan staf Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.
5. Siti Sulistyaningsih Sutaji yang selalu memberi semangat, serta mendo'akanku.
6. Sahabatku Hilmi dan teman-teman yang selalu menyemangati dan menemaniku berjuang.
7. Semua pihak yang telah membantu penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi masyarakat, bagi perkembangan ilmu kefarmasian pada khususnya dan ilmu pengetahuan pada umumnya. Amin.

Semarang, 10 Agustus 2020



Penulis

## DAFTAR ISI

|                                                           |      |
|-----------------------------------------------------------|------|
| HALAMAN JUDUL .....                                       | i    |
| INTISARI .....                                            | ii   |
| <i>ABSTRACT</i> .....                                     | iii  |
| PENGESAHAN SKRIPSI .....                                  | iv   |
| KATA PENGANTAR .....                                      | vii  |
| DAFTAR ISI.....                                           | ix   |
| DAFTAR TABEL.....                                         | xi   |
| DAFTAR GAMBAR .....                                       | xii  |
| DAFTAR LAMPIRAN.....                                      | xiii |
| BAB I. PENDAHULUAN .....                                  | 1    |
| A. Latar Belakang .....                                   | 1    |
| B. Rumusan Masalah.....                                   | 3    |
| C. Tujuan Penelitian .....                                | 3    |
| D. Manfaat Penelitian .....                               | 4    |
| E. Tinjauan Pustaka.....                                  | 4    |
| 1. Vitamin B2 dan Vitamin B6.....                         | 4    |
| 2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .....          | 5    |
| 3. Validasi.....                                          | 9    |
| 4. Sari Buah Apel .....                                   | 12   |
| F. Landasan Teori.....                                    | 13   |
| G. Hipotesis .....                                        | 14   |
| BAB II. METODE PENELITIAN.....                            | 15   |
| A. Bahan dan Alat yang Digunakan .....                    | 15   |
| B. Jalannya Penelitian.....                               | 15   |
| 1. Pembuatan Larutan Stok Vitamin B2 dan Vitamin B6 ..... | 15   |
| 2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal.....              | 16   |
| 3. Optimasi Fase Gerak .....                              | 16   |
| 4. Pembuatan Fase Gerak .....                             | 17   |
| 5. Pembuatan Kurva Baku.....                              | 17   |
| 6. Validasi.....                                          | 17   |
| BAB III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....            | 21   |

|                                    |                                                                      |    |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----|
| A.                                 | Penentuan Panjang Gelombang Maksimal Vitamin B2 dan Vitamin B6 ..... | 21 |
| B.                                 | Optimasi Fase Gerak.....                                             | 22 |
| C.                                 | Pembuatan Kurva Baku Vitamin B2 dan Vitamin B6 .....                 | 24 |
| D.                                 | Validasi Metode Analisis .....                                       | 26 |
| 1.                                 | Selektivitas (spesifisitas) .....                                    | 26 |
| 2.                                 | Linieritas.....                                                      | 27 |
| 3.                                 | Presisi (ketelitian).....                                            | 30 |
| 4.                                 | Akurasi (ketepatan) .....                                            | 31 |
| 5.                                 | Sensitivitas.....                                                    | 34 |
| E.                                 | Penetapan Kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dalam Sediaan.....         | 35 |
| BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN ..... |                                                                      | 37 |
| A.                                 | Kesimpulan .....                                                     | 37 |
| B.                                 | Saran .....                                                          | 37 |
| DAFTAR PUSTAKA .....               |                                                                      | 38 |
| LAMPIRAN.....                      |                                                                      | 40 |

## DAFTAR TABEL

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 1. Hasil optimasi komposisi fase gerak.....             | 23 |
| Tabel 2. Hasil kurva baku vitamin B2 .....                    | 24 |
| Tabel 3. Hasil kurva baku vitamin B6 .....                    | 25 |
| Tabel 4. Hasil uji linieritas vitamin B2 .....                | 28 |
| Tabel 5. Hasil uji linieritas vitamin B6 .....                | 29 |
| Tabel 6. Hasil uji presisi vitamin B2 dan B6 .....            | 31 |
| Tabel 7. Hasil uji akurasi vitamin B2.....                    | 32 |
| Tabel 8. Hasil uji akurasi vitamin B6.....                    | 33 |
| Tabel 9. Hasil Penetapan Kadar Vitamin B2 Dalam Sampel .....  | 35 |
| Tabel 10. Hasil Penetapan Kadar Vitamin B6 dalam Sampel ..... | 36 |

## DAFTAR GAMBAR

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gambar 1. Struktur Kimia Vitamin B2 ( Depkes, 1995) .....                     | 4  |
| Gambar 2. Struktur Kimia Vitamin B6 ( Depkes, 1995) .....                     | 5  |
| Gambar 3. Skema komponen KCKT .....                                           | 9  |
| Gambar 4. Hasil Optimasi Panjang Gelombang Vitamin B2 dan Vitamin B6....      | 22 |
| Gambar 5. Kromatogram hasil optimasi komposisi fase gerak .....               | 23 |
| Gambar 6. Kurva baku vitamin B2 .....                                         | 25 |
| Gambar 7. Kurva baku vitamin B6 .....                                         | 26 |
| Gambar 8.Kromatogram vitamin B2 dan vitamin B6 dalam sampel.....              | 27 |
| Gambar 9. Hubungan linier antara konsentrasi vitamin B2 terhadap luas area .. | 29 |
| Gambar 10. Hubungan linier antara konsentrasi vitamin B6 terhadap luas area   | 30 |

## DAFTAR LAMPIRAN

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Lampiran 1. Surat keterangan Penelitian .....                              | 41 |
| Lampiran 2. Certificate Of Analisisist (COA) Riboflavin/ Vitamin B2.....   | 42 |
| Lampiran 3. Certificate Of Analisisist (COA) Piridoksin/ Vitamin B6 .....  | 43 |
| Lampiran 4. kromatogram uji presisi vitamin B2 dan B6 replikasi 6.....     | 44 |
| Lampiran 5. Perhitungan LOD dan LOQ pada uji sensitivitas vitamin B2 ..... | 47 |
| Lampiran 6. Perhitungan LOD dan LOQ pada uji sensitivitas vitamin B6 ..... | 50 |
| Lampiran 7. Skema Jalannya Penelitian .....                                | 53 |
| Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian .....                                   | 54 |

## **BAB I. PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Vitamin B2 (riboflavin) banyak berperan penting dalam metabolisme tubuh manusia vitamin ini berperan dalam pembentukan molekul steroid, sel darah merah, dan glikogen serta menyokong pertumbuhan berbagai organ tubuh seperti kulit, rambut, dan kuku (Permana, 2018). Dampak dari defisiensi/kekurangan dari vitamin B2 yaitu sudut mulut pecah-pecah, lidah tampak merah dan licin, gampang lelah, kulit bersisik, sariawan, gampang kesemutan.

Vitamin B6 (piridoksin) diperlukan dalam beberapa proses metabolisme, tubuh membutuhkan vitamin B6 untuk perkembangan otak selama masa kehamilan serta fungsi kekebalan tubuh (Maritha, 2018). Dampak dari defisiensi/kekurangan dari vitamin B6 yaitu kurang nafsu makan, gampang lelah, kram otot, luka pada gusi dan lidah.

Ariani dkk., (2015) melakukan beberapa penelitian yaitu menggunakan spektrofotometri UV untuk menganalisis kafein dan vitamin B6 secara simultan dalam minuman berenergi. Yanith menganalisis kadar vitamin B1, B2, B3 dan B6 dalam sediaan sirup dengan metode eluasi isokratik KCKT. Penelitian berikutnya adalah penentuan Vitamin B1, B6, B12 dalam sediaan Kapsul dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), diperoleh hasil bahwa validasi beberapa parameter seperti presisi, akurasi, dan linieritas telah memenuhi persyaratan analisis.

Budiarti dan Herdiyanti (2018) melakukan validasi metode penetapan kadar INH dan vit B6 menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) serta

aplikasinya dalam sediaan sirup tuberkulosis. Pengembangan metode menggunakan KCKT Jasco dengan detektor UV-Vis. Fase diam adalah C18 dan fase gerak berupa campuran dapar fosfat dan asetonitril (75:25 v/v) dengan waktu alir 1,2 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.

Pagama dkk., (2015) Pada penelitian ini digunakan KCKT detektor UV dengan sistem elusi gradien dimana komposisi fase gerak berubah selama proses pengukuran berlangsung. Fase gerak yang digunakan adalah dapar fosfat 10mM pH 4,5 (A) dan campuran dapar fosfat : asetonitril, 7:3 (B). Sebagai fase diam digunakan kolom Atlantis T3 C18 (4,6 mmx 150 mm), 5 $\mu$ m. Suhu oven 35°C, dengan laju alir 0,5 ml/menit dan volume penyuntikan 20  $\mu$ l. Detektor UV diset pada panjang gelombang 290 nm untuk pengukuran piridoksin HCL, 280 untuk asam folat dan 270 nm untuk riboflavin.

Menurut Farmakope Indonesia Edisi IV (1995) piridoksin dapat ditetapkan kadarnya secara KCKT menggunakan fase gerak campuran asam asetat glasial P, 1,2 g natrium 1-heksanasulfonat P dan lebih kurang 1400 ml air dalam labu takar 2000 ml dan dideteksi dalam panjang gelombang 280 nm.

Berdasarkan latar belakang diatas maka dilakukan penelitian tentang validasi metode penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 menggunakan KCKT dan aplikasinya pada minuman sari buah apel.



## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, maka dapat dirumuskan rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 menggunakan fase gerak campuran methanol: air : asam asetat glasial (10: 90: 1) dapat memenuhi persyaratan selektivitas, linieritas, presisi, akurasi, dan sensitivitas?
2. Apakah metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan dalam penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 pada sediaan sari buah apel?
3. Apakah kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dalam sediaan minuman sari buah apel memenuhi standart yang ditetapkan oleh BPOM maksimal 50 mg dan 100 mg perhari ?

## **C. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Melakukan metode penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak methanol: air: asam asetat glasial (10: 90: 1 ).
2. Mengaplikasikan metode validasi KCKT pada sediaan minuman sari buah apel.
3. Mengetahui kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dalam sediaan minuman sari buah apel dan kesesuaiannya dengan standar yang telah ditetapkan BPOM maksimal 50 mg perhari.

#### D. Manfaat Penelitian

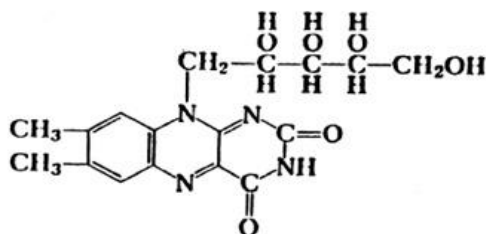
Manfaat penelitian ini adalah sebagai media sumber pengetahuan ilmu baru dan memberikan informasi kepada masyarakat tentang penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dan pengaplikasiannya pada sediaan minuman sari buah apel menggunakan KCKT.

#### E. Tinjauan Pustaka

##### 1. Vitamin B2 dan Vitamin B6

Vitamin B2 mempunyai rumus molekul  $C_{12}H_{20}N_4O_6$  dengan berat molekul 376,37. Nama lain atau nama kimia vitamin B2 yaitu riboflavin. Pemerian vitamin B2 berupa serbuk hablur, kuning jingga, bau lemah, melebur pada suhu lebih kurang  $280^{\circ}$  vitamin B2 sangat sukar larut dalam air, dalam etanol dan dalam larutan natrium klorida 0,9% sangat mudah larut dalam larutan alkali encer tidak larut dalam eter dan dalam kloroform.

Menurut aturan BPOM Nomor HK.00.05.23.3644. yaitu dalam sehari penggunaan maksimal vitamin B2 adalah 50 mg.

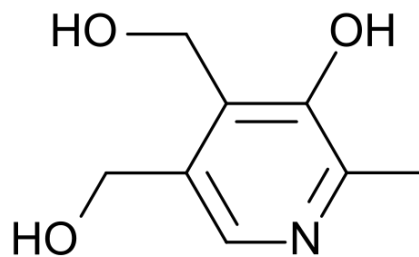


Gambar 1. Struktur Kimia Vitamin B2 (Depkes, 1995)

Vitamin B6 mempunyai rumus molekul  $C_8H_{11}NO_3HCL$  dengan berat molekul 205,64. Nama lain atau nama kimia dari vitamin B6 adalah

Piridoksin Hidroklorida. Pemerian vitamin B6 hablur atau serbuk hablur putih atau hampir putih, stabil di udara, secara perlahan-lahan dipengaruhi oleh cahaya matahari, mudah larut dalam air, sukar larut dalam etanol, tidak larut dalam eter.

Menurut aturan BPOM Nomor HK.00.05.23.3644. yaitu dalam sehari penggunaan maksimal vitamin B6 adalah 100 mg .



Gambar 2. Struktur Kimia Vitamin B6 ( Depkes, 1995)

## 2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam system yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion. Dengan demikian masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik (Depkes, 1995).

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia (analit) yang berdasarkan pada perbedaan migrasi/ distribusi masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam ( stationary phase)

dibawah pengaruh fase gerak ( mobile phase), fase gerak dapat berupa gas atau zat cair dan fase diam dapat berupa zat padat (Susanti & Dachriyanus, 2017).

Kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detector yang sensitif telah menyebabkan perubahan kromatografi kolom cair menjadi suatu sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Metode ini dikenal sebagai kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Depkes, 1995).

KCKT dapat dipandang sebagai pelengkap kromatografi gas, Dalam banyak hal kedua teknik ini dapat digunakan untuk memperoleh efek pemisahan yang sama membaiknya. Bila derivatisasi diperlukan pada KG, namun pada KCKT zat-zat yang tidak diderivatisasi dapat dianalisis. Untuk zat-zat yang labil pada pemanasan atau tidak menguap, KCKT adalah pilihan utama. Namun demikian bukan berarti KCKT menggantikan KG, tetapi akan memainkan peranan yang lebih besar bagi para analis laboratorium (Putra, 2004).

KCKT menawarkan beberapa keuntungan disbanding dengan kromatografi cair klasik, antara lain (Putra, 2004):

a. Cepat

Waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15-30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit (uncomplicated), waktu analisis kurang dari 5 menit bisa dicapai.

b. Resolusi

Berbeda dengan kromatografi gas, kromatografi cair mempunyai dua fase dimana interaksi selektif dapat terjadi pada kromatografi gas, gas yang mengalir sedikit berinteraksi dengan zat padat pemisahan terutama dicapai hanya dengan fase diam. Kemampuan zat padat berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak pada KCKT memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.

c. Sensitivitas detektor

Detector absorbs UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi Kadar dalam jumlah nanogram ( $10^{-9}$  gram) dari bermacam-macam zat.

d. Kolom yang dapat digunakan kembali

Berbeda dengan kolom kromatografi klasik, kolom KCKT dapat digunakan kembali (reusable).

e. Ideal untuk zat bermolekul besar dan berionik

Zat-zat yang tidak bisa dianalisis dengan KG karena kapasitas rendah, biasanya diderratisasi untuk menganalisis spesies ionic. KCKT dengan tipe eksklusi dan penukar ion ideal sekali untuk menganalisis zat-zat tersebut.

f. Mudah *recovery* sampel

Umumnya setektor yang digunakan dalam KCKT tidak menyebabkan destruktif (kerusakan) pada komponen sampel yang diperiksa, oleh karena

itu komponen sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detektor.

Kelemahan Spektrofotometer Ultra-violet dan Sinar Tampak dalam analisis kualitatif adalah kurang teliti. Hal tersebut disebabkan karena pita-pita absorpsi yang diperoleh melebar, dengan demikian kurang khusus atau terbatas pemakaiannya (Triyati, 1985).

Instrumen KCKT terdiri dari beberapa bagian yaitu :

a. Wadah fase gerak

Berfungsi sebagai tempat atau persediaan fase gerak.

b. Pompa

Merupakan suatu alat yang berfungsi untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduksi, konstan, dan bebas dari gangguan (Harmita, 2004)

c. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan sampel kedalam kolom pada saat pengisian sampel. Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom dan kelebihan akan masuk ke pembuangan.

d. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Terdapat dua jenis kolom dalam KCKT yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobar (Harmita, 2004)

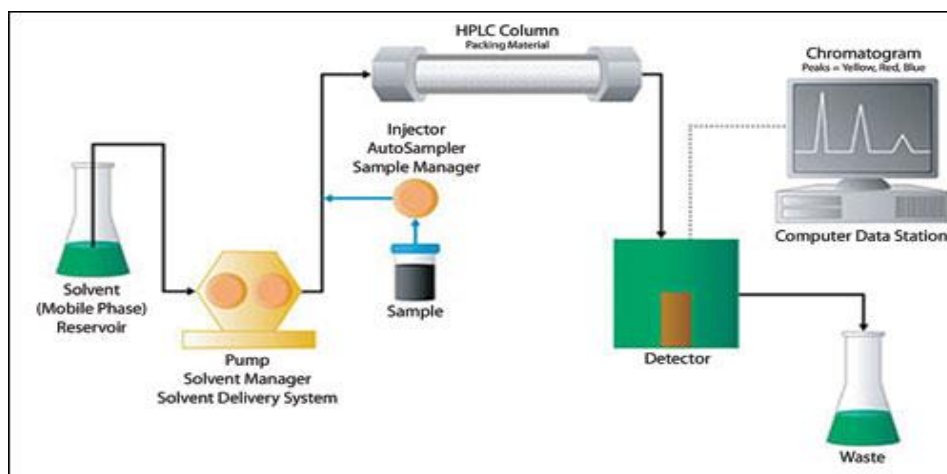
Kolom adalah jantung kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai (Putra, 2004).

e. Detektor

Suatu detector dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom ( analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitifitas yang tinggi, gangguan (noise) yang rendah, kisar respons linier yang luas, dan memberi respons untuk semua tipe senyawa (Putra, 2004).

f. Komputer atau integrator

Komputer atau integrator berfungsi untuk mengumpulkan data yang dihubungkan dengan detector. Alat ini mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detector lalu memplotkan sebagai suatu kromatogram (Harmita, 2004).



Gambar 3. Skema komponen KCKT

### **3. Validasi**

Validasi metoda analisis merupakan proses yang dilakukan melalui percobaan laboratorium dimana karakteristik dari suatu prosedur memenuhi persyaratan untuk aplikasi analisis (Thirunarayanan & S. Manikandan, 2014). Validasi adalah proses yang menunjukkan atau mengkonfirmasi karakteristik kinerja dari suatu metode analisis (AOAC, 2013). Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya (Harmita, 2004).

#### **a. Selektivitas (Spesifisitas)**

Selektivitas merupakan nilai retensi relative tiap komponen oleh fase diam (Susanti & Dachriyanus, 2017). Selektivitas atau spesifitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Gandjar & Rohman 2007). Metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa placebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi.



b. Linieritas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linieritas yang dapat diterima.

c. Keseksamaan (*precision*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Untuk mencapai kecermatan yang tinggi dapat dilakukan dengan cara menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, pelaksanaanya yang cermat, taat asa sesuai prosedur.

d. Rentang penerimaan akurasi atau *recovery* berdasarkan Gandjar dan Rohman (2007) adalah sebesar 95-105%. Terdapat beberapa sumber yang menyatakan rentang akurasi yang beragam. Rentang akurasi yang dimaksud tersebut menerangkan semakin kecil zat yang dianalisis maka akan semakin besar pula rentang akurasi dan berlaku pula sebaliknya semakin besar zat yang dianalisis maka akan semakin kecil pula rentang penerimaan akurasinya.

e. Sensitivitas (kepekaan)

Batas deteksi (LOD) merupakan konsentrasi paling rendah dalam sampel yang masih terdeteksi, tetapi tidak selalu bisa dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit berada diatas atau dibawah nilai tertentu. Batas nilai kuantitasi (LOQ) yaitu konsentrasi analit paling rendah pada sampel yang ditentukan dengan presisi dan akurasi yang bisa diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. LOD dan LOQ diekspresikan sebagai konsentrasi (Ganjar dan Rohman, 2007). LOD dan LOQ bisa dihitung secara statistic dengan regresi linier dan kurva kalibrasi.

#### **4. Sari Buah Apel**

Apel merupakan buah yang bermanfaat bagi tubuh manusia. Apel merupakan buah yang kaya kandungan quercetin yang merupakan salah satu flavonoid yang dipercaya dapat melindungi tubuh dari beberapa penyakit degeneratif dengan mencegah proses peroksidasi lemak (Anggun, 2014).

Apel merupakan salah satu buah yang digemari oleh masyarakat Indonesia rata - rata konsumsi apel di Indonesia hingga 1,1 kg perkapita pertahun menurut Badan Pusat Statistik tahun 2006 sehingga apel selain dikonsumsi secara langsung apel dapat dikonsumsi dengan cara lain yaitu dengan dibuat minuman berupa sari buah apel (Hanifah, 2006).

Penurunan kadar vitamin karena saat pembuatan sari apel menggunakan pemanasan. Kerusakan vitamin juga terjadi karena kontak

bahan oleh logam saat penyaringan dan pembilasan sari apel. Penyimpanan dan sinar matahari juga dapat merusak vitamin karena sifat dari vitamin yaitu rentan terhadap sinar matahari (Wahono, 2014). Batas maksimal vitamin B2 dan vitamin B6 yaitu 50 mg/hari dan 100 mg /hari.(BPOM RI, 2004).

#### **F. Landasan Teori**

Budiarti dan Herdiyanti (2018) melakukan validasi metode penetapan kadar INH dan vit B6 menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) serta aplikasinya dalam sediaan sirup tuberkulosis. Pengembangan metode menggunakan KCKT Jasco dengan detektor UV-Vis. Fase diam adalah C18 dan fase gerak berupa campuran dapar fosfat dan asetonitril (75:25, v/v) dengan waktu alir 1,2 mL/menit pada panjang gelombang 280 nm.

Pagama dkk., (2015) Pada penelitian ini digunakan KCKT detektor UV dengan sistem elusi gradien di mana komposisi fase gerak berubah selama proses pengukuran berlangsung. Fase gerak yang digunakan adalah dapar fosfat 10 mM pH 4,5 (A) dan campuran dapar fosfat : asetonitril, 7:3 (B). Sebagai fase diam digunakan kolom Atlantis T3 C18 (4,6 mm x 150 mm), 5  $\mu$ m. Suhu oven 35 °C, dengan laju alir 0,5 mL/menit dan volume penyuntikan 20  $\mu$ L. Detektor UV diset pada panjang gelombang 290 nm untuk pengukuran piridoksin HCl, 280 untuk asam folat dan 270 nm untuk riboflavin.

Menurut Farmakope Indonesia Edisi IV (1995) , vitamin B6 dapat ditetapkan kadarnya secara KCKT menggunakan fase gerak campuran asam asetat glasial P, 1,2 g natrium 1-heksanasulfonat P dan lebih kurang 1400 ml air dalam labu takar 2000 ml dan dideteksi dalam panjang gelombang 280 nm.

### **G. Hipotesis**

1. Validasi metode penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak methanol: air: asam asetatglasial ( 10: 90: 1).
2. Metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 pada minuman sari buah apel.
3. Kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dalam sediaan minuman sari buah apel yang dilakukan sesuai dengan standar ketetapan BPOM.

## **BAB II. METODE PENELITIAN**

### **A. Bahan dan Alat yang Digunakan**

#### **1. Bahan**

Bahan – bahan yang digunakan adalah sampel minuman sari apel kemasan “ brand x “ , bahan baku pembanding adalah vitamin B2 (riboflavin), vitamin B6 (piridoksin hcl), water for injection (WFI), asam asetat glasial, methanol, Naoh, dan aquadest.

#### **2. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat KCKT (jazco) terdiri dari pompa (PU 2080 plus), kolom C18 Lichosper 100 RP – (100 mm x 4,6 mm ID, 5µm), detektor UV (2070 plus) dan pengolahan data komputer (Ezchrom elite), spektrofotometer UV-Vis (1080 Shimadzu), syringe (Hamilton), pH meter (Handylab), timbangan analitik (Ohaus), penyaring eluen (Whatman), Digital Ultrasonic Cleaner (Jeken), mikropipet (Socorex), alat-alat gelas yang lazim digunakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.

### **B. Jalannya Penelitian**

#### **1. Pembuatan Larutan Stok Vitamin B2 dan Vitamin B6**

Baku pembanding vitamin B2 ditimbang seksama sejumlah 100 mg. Vitamin B2 dimasukkan kedalam labu takar 100 ml, ditambahkan beberapa tetes Naoh 0,1 N sampai larut. Vitamin B2 dilarutkan dengan fase gerak methanol, air dan asam asetat glasial sampai tanda batas sehingga diperoleh 1000 ppm. Larutan

diultrasonifikasi selama 15 menit, dan disaring dengan membran penyaring nylon 0,45  $\mu\text{m}$ .

Baku pembanding vitamin B6 ditimbang seksama sejumlah 100 mg. Vitamin B6 dimasukkan kedalam labu takar 100 ml. Vitamin B6 dilarutkan dengan fase gerak methanol,air dan asam asetat glasial sampai tanda batas sehingga diperoleh 1000 ppm. Larutan diultrasonifikasi selama 15 menit, dan disaring dengan membran penyaring nylon 0,45  $\mu\text{m}$ .

## **2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal**

Optimasi panjang gelombang menggunakan spektrofotometer UV. Larutan standar vitamin B2 dan B6 konsentrasi 20  $\mu\text{g/ml}$  dalam fase gerak metanol: air: asam asetat glasial (10: 90: 1 v/v/v) di scanning pada panjang gelombang antara 200-400 nm, selanjutnya dipilih panjang gelombang yang optimal. Penelitian yang dilakukan (Ariani dkk, 2015) menyebutkan bahwa panjang gelombang maksimal vitamin B2 dan B6 adalah 280 nm.

## **3. Optimasi Fase Gerak**

Optimasi komposisi fase gerak terdiri dari campuran metanol: air: asam asetat glasial dengan perbandingan metanol: air: asam asetat glasial (15: 85: 1 v/v/v), metanol : air : asam asetat glasial ( 20: 80: 1 v/v/v), metanol: air: asam asetat glasial (10: 90: 1 v/v/v). Selanjutnya dipilih perbandingan fase gerak yang memberikan data yang optimal. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/ menit.

#### **4. Pembuatan Fase Gerak**

Fase gerak dari campuran metanol, air dan asam asetat glasial dengan perbandingan (10: 90: 1). Untuk membuat 250 ml diambil 24,7 ml metanol dimasukkan labu takar 250 ml kemudian ditambahkan air 222,7 ml dan asam asetat glasial 2,4 ml. Campuran diultrasonifikasi selama 15 menit.

#### **5. Pembuatan Kurva Baku**

Larutan stok baku vitamin B2 dan vitamin B6 konsentrasi 1000 µg/ml vitamin B2 dipipet 2, 4, 6, 8, 10, 12 µl dan vitamin B6 dipipet 5, 10, 15, 20, 25, 30 µl dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Masing-masing labu takar ditambahkan fase gerak sampai tanda batas dan kocok hingga homogen sehingga diperoleh konsentrasi vitamin B2 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2 µg/ml dan vitamin B6 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 µg/ml.

Kemudian masing-masing larutan disaring dengan membran *nylon* 0,45 µm, dan diinjeksikan ke sistem KCKT dengan volume penyuntikan 20 µl dideteksi pada panjang gelombang 280 nm dengan laju alir 1,0 mL/menit. Hasil kromatogram dihitung persamaan regresi liniernya.

#### **6. Validasi**

##### **a. Uji selektivitas (spesifisitas)**

Berdasarkan kromatogram dapat dilihat apakah puncak analit vitamin B2 dan vitamin B6 dan komponen lain dalam minuman terpisah sempurna. Selektifitas dapat ditentukan nilainya dengan rumus :

$$R = 2 \frac{(T_{R2} - T_{R1})}{W1 + W2}$$

Keterangan :

R = resolusi

$t_{r1}$  = waktu retensi puncak pertama

$t_{r2}$  = waktu retensi puncak kedua

W1 = lebar dasar puncak pertama

W2 = lebar dasar puncak kedua

#### b. Uji Linieritas

Persamaan regresi linier yaitu  $Y = bx + a$ . Uji linieritas dilakukan dengan cara (Miller dan Miller, 2005). Larutan stok baku vitamin B2 dan vitamin B6 dengan konsentrasi 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2 µg/ml dan 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 µg/ml disaring dengan membrane syringe 0,45µL lalu diinjeksikan sebanyak 20 µL ke alat KCKT. Luas area vitamin B2 dan vitamin B6 yang diperoleh setiap konsentrasinya dibuat persamaan linier dan dihitung koefisien relasinya. Uji dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali setiap konsentrasinya. Persamaan regresi yang baik digunakan untuk menetapkan suatu kadar zat.

#### c. Uji presisi (Ketelitian)

Larutan yang mengandung vitamin B2 0,4 µg/mL dan vitamin B6 1µg/Ml disaring dengan membran penyaring 0,45 µm di injeksikan sebanyak 20 µL ke alat KCKT pada kondisi optimum. Didapatkan luas area, waktu retensi dan tinggi puncak vitamin B2 dan vitamin B6 dicatat Percobaan direplikasi sebanyak 6 kali untuk masing-masing kadar.



Uji presisi dilakukan dengan menentukan parameter RSD (*Relative Standart Deviasi*) dengan rumus sebagai berikut ( Gandjar & Rohman,2007):

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

Keterangan :

RSD = Standar Deviasi Relatif

SD = Standar Deviasi

$\bar{X}$  = Kadar rata-rata sampel

d. Uji Akurasi ( Ketepatan)

Akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku (*standart addition method*) melalui uji perolehan kembali pada sampel yang ditambah baku pembanding dengan konsentrasi meliputi 80%, 100%, dan 120% yaitu 168 ppm, 210 ppm , 252 ppm dari kadar vitamin B2 dan vitamin B6. Masing-masing larutan disaring menggunakan membran penyaring 0,45  $\mu$ m kemudian diinjeksikan sebanyak  $\mu$ L ke alat KCKT dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 280 nm dengan laju alir 1 mL/menit. Masing-masing konsentrasi direplikasi sebanyak 3 kali.

Perolehan kembali dihitung dengan cara membandingkan jumlah vitamin B2 dan vitamin B6 untuk masing-masing penambahan baku terhadap kadar vitamin B2 dan vitamin B6 yang ditambahkan. Perhitungan perolehan kembali (% *recovery*) ditetapkan dengan rumus (Gandjar & Rohman 2007) :

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

Keterangan :

A = Konsentrasi sampel setelah penambahan bahan baku

B = Konsentrasi sampel sebelum penambahan bahan baku

C = Konsentrasi bahan baku yang ditambahkan

e. Uji sensitivitas

Kepekaan dapat diukur dengan nilai limit deteksi (LOD) dan batas kuantitatif (LOQ). Nilai LOD merupakan batas deteksi suatu analit, kadar terkecil analit dalam sampel yang dapat terdeteksi dan masih memberikan respon berbeda dengan respon blanko. Nilai LOD diperoleh dari persamaan  $Y = Y_a + 3S_b$ . Nilai LOQ diperoleh dari persamaan  $Y = Y_a + 10 S_b$ . LOQ merupakan kuantitas terkecil dalam sampel yang masih dapat menunjukkan pengukuran secara teliti dan tepat. Semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif pula suatu metode.

## **7. Penetapan Kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dalam Sari Buah Apel**

Sampel minuman diambil 1 ml dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml dan dilarutkan dengan fase gerak sampai tanda. Larutan selanjutnya disentrifugasi 600 ppm selama 10 menit. Sampel minuman disaring dengan nylon 0,45  $\mu\text{m}$ . Sampel kemudian diinjeksikan ke instrumen KCKT pada panjang gelombang 280 nm dengan kecepatan elusi 1 ml/menit.

**HALAMAN INI TIDAK TERSEDIA**

**BAB III**

**DAPAT DIAKSES MELALUI  
UPT PERPUSTAKAAN UNWAHAS**

## **BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Metode penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak berupa campuran metanol: air: asam asetatglasial ( 20: 80: 1 v/v/v), memenuhi persyaratan selektivitas, linieritas, presisi, akurasi, dan sensitivitas.
2. Metode penetapan kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dapat diaplikasikan pada sediaan minuman sari buah apel.
3. Kadar vitamin B2 dan vitamin B6 dalam sampel memenuhi syarat yang ditetapkan BPOM yaitu 50 mg/saji dan 100 mg/saji.

### **B. Saran**

Perlu dilakukan lebih lanjut mengenai penetapan kadar vitamin B2 dan B6 dengan metode KCKT menggunakan fase gerak dan fase diam yang berbeda serta bentuk sediaan lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC, 2013, *Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*, Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., USA.
- Aprilia, D., Susanto, W.H., 2014, Pembuatan Sari Apel (*Malus sylvestris* Mill) Dengan Ekstraksi Metode Osmosis (Kajian Varietas Apel Dan Lama Osmosis), *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Universitas Brawijaya, Malang.
- Ariani, N.L.K., Susanti, N.M., Sibrani, J., 2015, Perbandingan Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Eluasi Gradien dengan Isokratik pada Penentuan Vitamin B1, B2, B6 dalam Sirup Multivitamin secara Simultan, *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 3(12):1-8.
- Budiarti, A., dan Herdiyanti, N.Y., 2018, Validasi Metode Penetapan Kadar Isoniazid Dan Vitamin B6 Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Serta Aplikasinya Dalam Sediaan Sirup Obat Tuberkulosis, *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksata*, ISSN 2528-5912.
- BPOM, 2004, Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan Nomor HK.00.05.23.3644., Badan Pengawas Obat dan Makanan, Indonesia.
- Cempaka, A.R., Sanarto, S., Laksmi, K.T., 2014, Pengaruh Metode Pengolahan (Juicing Dan Blending) Terhadap Kandungan Quercetin Berbagai Varietas Apel Lokal Dan Impor (*Malus Domestica*), *Indonesia Journal of Human Nutrition*, Universitas Brawijaya, Malang.
- Depkes RI., 1995, Farmakope Indonesia Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi, Cetakan 1, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1 (3), 117-135.
- Hidayati, N., Penentuan Tiamin, Riboflavin, Dan Piridoksin Dalam Beras Dengan HPLC Secara Serentak, *Jurnal*, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Batan.
- Huda, H.H., Aditya, G., Rahmawati, S.P., 2015, Efektivitas Konsumsi Buah Apel (*Pyrus Malus*) Jenis Fuji Terhadap Skor Plak Gigi Dan pH Saliva, *Medali Jurnal*, 2 (1).

- Maritha, V., Raishing, R., 2018, Analisis Vitamin B6 (Piridoksin) Pada Sediaan Tablet Multivitamin Neurotopi Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis, *Jurnal*, Jurnal Keperawatan LPMM Diam Husada Mojokerto.
- Miller, J.C and Miller, J.N., 2005, *Statistik And Chemometrics For Analytical Chemistry*, 5 Editio, Pearson Educaton Limited, Edinburg Gate, England, 115.
- Pagama, N., Rifai, Y., dan Aswad, M., 2018, Penetapan Kadar Riboflavin, Piridoksin Hcl, Dan Asam Folat Dalam Susu Forula Bayi Dngan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), *Majalah Farmasi dan Farmakologi Unhas* 22(2):40-43.
- Permana, Y, E., Santoso, E., dan Dewi, C., 2018, Implementasi Metode Dempser-Shafer untuk Diagnosa Defisiensi (Kekurangan) Vitamin Pada Tubuh Manusia, *Jurnal pengembangan teknologi dan ilmu komputer* 2(3): 1994-1203.
- Putra, Effendy De L., 2004, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi, Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Susanti, M., & Dachyanus, 2017, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi, Universitas Andalas, Padang.
- Thirunarayan, G., & S. Manikandan, 2015, *Development and validation of dissolution method for levocetirizine dihydrochloride by isocratic reserve phase HPLC*, *World Scientific News* 11, 1-17.
- Triyati, Etty, 1985, Spektrofotometer Ultra-Violet Dan Sinar Tampak Serta Aplikasinya Dalam Oseanologi, *Jurnal Oceana*, 10 (1), 39-47