

Pengembangan dan Validasi Metode KCKT Fase Terbalik untuk Analisis Senyawa Ranitidin, Simetidin, Asetosal Menggunakan Desain Faktorial

Development and Validation of Reversed Phase HPLC Method for Analysis of Ranitidine, Cimetidine, and Acetosal Compounds Using Factorial Design

Amanda Kusumaning Astari*, Iswandi, Dian Marlina

Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta, Indonesia

*email korespondensi: amanda.ka330@gmail.com

ABSTRAK

Perbedaan sifat fisikokimia antara ranitidin, simetidin, dan asetosal mempengaruhi hasil analisis pada metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi dan memvalidasi metode KCKT fase terbalik untuk analisis simultan ketiga senyawa tersebut. Metode penelitian menggunakan eksperimen laboratorium pada pengembangan sistem KCKT fase terbalik menggunakan desain faktorial 2^3 . Desain faktorial dilakukan menggunakan tiga faktor independen pada dua level yaitu dapar asetat (level -1: 4; level +1: 5), konsentrasi dapar asetat (level -1: 0,005 M; level +1: 0,1 M), laju alir (level -1: 0,5 mL/menit; level +1: 1 mL/menit). Respon yang digunakan untuk mengevaluasi optimasi adalah nilai puncak resolusi (R_s). Kondisi kromatografi optimum dicapai menggunakan detektor UV panjang gelombang 230 nm, laju alir 0,5 mL/menit, fase gerak asetonitril:dapar asetat 0,05 M pada pH 5 (20:80 v/v). Kondisi optimum ini menghasilkan pemisahan yang memenuhi syarat dengan nilai pada puncak pertama dengan puncak kedua 1,509 dan pada puncak kedua dengan puncak ketiga 5,495. Berdasarkan analisis interaksi antar variabel, menunjukkan adanya pengaruh pada ketiga variabel. Hasil validasi uji linearitas untuk ranitidin, simetidin, dan asetosal secara berturut-turut yakni 0,9989; 0,9989; dan 0,999. Nilai LOD diperoleh 2,59 ppm dan nilai LOQ diperoleh 8,64 ppm. Uji akurasi dengan %recovery 103,863% dan %RSD 1,819%. Metode yang digunakan terbukti valid ditunjukkan dengan hasil yang memenuhi syarat validasi metode.

Kata kunci: asetosal; desain faktorial; KCKT; optimasi; ranitidin; simetidin

ABSTRACT

Differences in physicochemical properties among ranitidine, cimetidine, and acetosal significantly affect High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis. This study aimed to optimize and validate a reversed-phase HPLC (RP-HPLC) method for the simultaneous determination of these three compounds using a 2^3 factorial design. Three independent variables at two levels were evaluated: acetate buffer pH (4 and 5), buffer concentration (0.005 M and 0.1 M), and flow rate (0.5 mL/min and 1.0 mL/min), with peak resolution (R_s) as the evaluation response for optimization. The optimal chromatographic conditions were achieved using a UV detector at 230 nm, a flow rate of 0.5 mL/min, and a mobile phase of acetonitrile:0.05 M acetate buffer at pH 5 (20:80, v/v). This condition yielded satisfactory chromatographic separation, with resolution values of 1.509 between the first and second peaks, and 5.495 between the second and third peaks. Interaction analysis indicated significant effects among the three variables. Method validation exhibited strong linearity with correlation coefficients (r) of 0.9989, 0.9989, and 0.9992 for ranitidine, cimetidine, and acetosal, respectively. The limit of detection (LOD) was 2.59 ppm and the limit of quantitation (LOQ) was 8.64 ppm. Accuracy testing yielded a mean recovery of 103.863%, with a precision (%RSD) of 1.819%. Overall, the method was proven valid as it fulfilled all validation requirements.

Keywords: acetosal; factorial design; HPLC; optimization; ranitidine; cimetidine

PENDAHULUAN

Reseptor H₂ blocker atau reseptor H₂ antagonis (H₂RA) adalah golongan penekan asam lambung, gastroesophageal reflux disease (GERD), tukak lambung atau duodenum, hipersekresi lambung, mulas, dan gangguan pencernaan ringan, serta penggunaannya telah disetujui oleh FDA untuk jangka pendek. Terdapat tiga jenis obat H₂ blocker yang disetujui oleh FDA, yaitu famotidin, ranitidin dan simetidin, sementara nizatidin hanya tersedia resep dokter (Nugent, Falkson dan Terrell., 2022). Ranidin hidroklorida memiliki pH antara 4,5 dan 6,0 (Departemen Kesehatan, 2020). Nilai pKa dari ranitidin yaitu 8,2 dan 2,7 serta nilai log P menunjukkan 0,2 (Kortejärvi et al., 2005). Simetidin memiliki nilai pH 5-9 dan nilai pKa 6,8 (Jantratid et al., 2006).

Penggunaan obat antiinflamasi nonsteroid seperti asetosal juga sangat luas, baik sebagai analgesik, antipiretik, maupun antiinflamasi, dan umum digunakan dalam terapi kardiovaskular. Penggunaan dosis rendah, asetosal digunakan untuk zat antitrombosis atau pengencer darah untuk mencegah agregasi platelet melalui penghambatan enzim siklooksigenase (DiPiro et al., 2020). Nilai log P asetosal yaitu 1,18 dan pKa 3,49 (Dressman et al., 2012). Mekanisme asetosal yaitu menghambat agregasi platelet, sehingga dapat meningkatkan risiko perdarahan dan berinteraksi dengan obat lain yang memiliki efek yang sama dengan cara memblokir aktivitas siklooksigenase-1 (COX-1) secara ireversibel selama masa hidup trombosit, sehingga menghambat produksi tromboksan A₂. Penurunan tromboksan A₂ dapat mengurangi aktivitas dan agregasi platelet (DiPiro et al., 2020).

Penentuan pengembangan metode pemisahan merupakan tugas utama dan sulit bagi analis farmasi, terutama jika semakin banyak pengotor atau kombinasi obat dengan struktur mirip ataupun tidak, sehingga perlu ditentukan. Selain itu, banyaknya obat baru yang dirilis di pasaran dengan jarak waktu antara peluncuran obat-obatan dan dimasukkannya ke dalam protokol farmasi yang sering kali lebih lama, sehingga berpotensi menimbulkan masalah dalam penggunaan obat secara terus-menerus dan luas, dan dapat memberikan efek samping baru. Perbedaan sifat fisika-kimia ranitidin dan simetidin sebagai basa lemah dengan gugus amina yang sensitif terhadap perubahan pH dan asetosal sebagai asam lemah yang mudah terhidrolisis menjadi asam salisilat (Skibinski & Komsta, 2016). Perbedaan sifat asam-basa ini dapat mempengaruhi derajat ionisasi, waktu retensi, bentuk puncak dan resolusi antar senyawa pada sistem KCKT. Kondisi ini menimbulkan tantangan dalam pengembangan metode KCKT secara simultan. Namun, belum ada metode yang melaporkan analisis secara simultan dari ketiga obat ini dengan KCKT menggunakan desain faktorial. Oleh karena itu,

karena adanya sifat fisik dan kimia yang berbeda, perlu dilakukan analisis senyawa obat untuk mendeteksi apakah obat tersebut dapat terdeteksi secara simultan.

Berdasarkan latar belakang tersebut perlu adanya pengondisian KCKT, seperti konsentrasi dapar, pH, dan laju alir sebagai variabel yang diujikan pada sampel obat ranitidin, simetidin, dan asetosal terhadap pemisahan. Ketidaktepatan dalam pemilihan kondisi kromatografi dapat menyebabkan resolusi yang tidak memadai. Oleh karena itu, diperlukan proses pengembangan metode yang sistematis untuk mendeteksi obat secara simultan yang dioptimasi dengan menggunakan desain faktorial untuk mempermudah analisis dengan efisien waktu dan bahan fase gerak. Keuntungan dari analisis obat secara simultan terletak pada penghindaran ekstraksi dan pemisahan yang memakan waktu cukup lama. Selain itu, dapat meminimalkan penggunaan reagen yang mahal. Diharapkan metode yang digunakan dapat memberikan hasil yang akurat. Penentuan dengan metode simultan dapat memudahkan kontrol analisis pada industri dalam menetapkan analisis senyawa obat dengan satu kondisi sistem KCKT dan fase gerak yang optimal untuk mendeteksi beberapa senyawa obat.

Senyawa H₂ blocker ini pernah dilakukan analisis secara simultan oleh Arayne et al., (2010) dengan hasil linieritas yang baik antara 0,9998-0,9979, dengan munculnya puncak simetidin terlebih dahulu, disusul ranitidin dan famotidin, dengan fase gerak metanol-air-trietilamin (20:80:0,05) pH 3. Sedangkan penelitian Ashiru, Patel, dan Basit (2007) menunjukkan famotidin muncul terlebih dahulu dengan menggunakan fase gerak yang terdiri dari asetonitril:dapar asetat 0,1 M, pH 5, laju alir 2 mL/menit, pada panjang gelombang 230 nm. Pada senyawa asetosal pernah dilakukan penelitian secara simultan dengan prasugel oleh Patel, M dkk (2013) menggunakan asetonitril:metanol:air (30:10:0, v/v) pH 3 yang disesuaikan dengan asam o-fosforat menghasilkan waktu retensi 3,2 menit dan 6,61 menit, pada penelitian tersebut asetosal menunjukkan lebih rentan terhadap hidrolisis basa. Penelitian Siswanto *et al.* (2016), asetosal dapat dianalisis dengan KCKT menggunakan fase gerak asetonitril: dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (30:70) dan kecepatan alir 1,5 mL/menit pada panjang gelombang 230 nm. Penelitian asam salisilat dan pengotor yang tidak dikenal dilakukan analisis dengan KCKT menggunakan fase gerak campuran 85 asam ortofosfat, asetonitril, dan aquadest (2:400:600 v/v/v) pada panjang gelombang 237 nm dengan laju alir ,0 mL/menit memberikan hasil validasi metode sesuai dengan pedoman ICH (Kowalska et al., 2022). Panjang gelombang yang digunakan yaitu 230 nm. Pada panjang gelombang ini diketahui dapat mengukur senyawa obat ranitidin, simetidin, dan asetosal.

Berdasarkan analisis secara simultan yang pernah dilakukan, belum ada penelitian analisis simultan menggunakan senyawa ranitidin, simetidin, dan asetosal, sehingga hal ini menjadi tantangan bagi peneliti untuk memenuhi kebutuhan analisis laboratorium untuk meningkatkan efisiensi waktu dan material, dengan harapan dalam sekali pengoperasian sistem yang terpilih mampu mendeteksi senyawa obat ranitidin, simetidin, dan asetosal baik secara simultan maupun tunggal. Sehingga *screening* yang diharapkan menjadi lebih cepat dan efisien.

Rancangan desain faktorial ini bertujuan untuk meminimalkan jumlah kombinasi perlakuan yang akan diuji. Metode pengembangan analisis dilakukan dengan menggunakan desain faktorial yang didasarkan pada prinsip-prinsip desain eksperimental untuk menganalisis H₂ blocker secara simultan dengan asetosal. Desain faktorial digunakan untuk mengoptimasi parameter analisis dengan mempertimbangkan interaksi antara faktor-faktor yang mempengaruhi metode (Bolton, 1997). Desain faktorial memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi efek individu dan interaksi dari faktor-faktor tersebut, guna memperoleh metode yang memenuhi persyaratan validasi dan dapat digunakan sebagai metode baku dalam pengujian kualitas sediaan farmasi atau sampel biologis.

METODE

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat KCKT merek *Shimadzu* yang dilengkapi dengan pompa (LC-20AD), kolom shim-pack GIST C18 *Shimadzu* berukuran 150 x 4,6 mm dan ukuran partikel 5 µm, detektor yang digunakan SPD-20A yang diatur pada panjang gelombang 230 nm, mikropipet 100 – 1000 µL (*Dragon Med*), neraca analitik (*Shimadzu*), sonikator (*Jeken*), membran *filter* 0,45 µm nilon (*steril membran solutions*), membran *filter* 0,22 µm nilon 47 mm (*steril membran solution*), *vaccum filtration set*, seperangkat alat gelas gelas beker (*Pyrex*) 50 ml; 250 mL; 500 mL, gelas ukur 100 mL, batang pengaduk, labu takar (5;10;25;100) mL, vial KCKT 2 mL (*Aijiren*).

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ranitidin HCl bahan baku pembanding Farmakope Indonesia (BPFI), simetidin BPFI, dan asetosal BPFI, aquadest grade KCKT, metanol grade KCKT, asetonitril grade KCKT, *water for injection (WFI)*, asam asetat glasial, natrium asetat, tisu dan *aluminium foil*.

Metode

Penentuan Kondisi Kromatografi

Penentuan kondisi kromatografi dilakukan dengan mencari fase gerak, pH, dan laju alir. Penentuan fase gerak dilakukan dengan membandingkan asetonitril:dapar asetat dengan konsentrasi 0,1 M dan 0,05 M dan variasi pH 4 dan 5. Penentuan laju alir dilakukan dengan menggunakan variasi 0,5 mL/menit dan 1,0 mL/menit pada suhu kamar 25 °C. Volume injeksi yang diinjeksikan dengan loop sampel yaitu 20 µL. Waktu analisis dilakukan selama 10 menit. Elusi dilakukan dalam penelitian ini dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap sama selama elusi).

Preparasi Larutan Induk

Larutan induk (100 µg/mL) disiapkan dari masing-masing obat H₂ blocker (ranitidin dan simetidin) dan asetosal BPFI dalam 100 mL metanol 20% dalam air (v/v), kemudian disonikasi dengan sonikator untuk menghomogenkan larutan.

Preparasi Larutan Sampel

Larutan induk ranitidin dan simetidin diencerkan hingga konsentrasi 40 ppm dan larutan induk asetosal diencerkan hingga konsentrasi 20 ppm dalam metanol 20%. Larutan yang telah diencerkan tersebut dipipet 1:1:1 dicampurkan dan disiapkan untuk tahap analisis kromatografi. Perbedaan konsentrasi asetosal yang sama atau lebih tinggi dari ranitidin dan simetidin dapat mempengaruhi hasil kromatogram puncak asetosal menjadi lebih tinggi, sehingga nilai konsentrasi asetosal diturunkan menjadi 20 ppm.

Preparasi Dapar Asetat untuk Fase Gerak

Persiapan dapar asetat untuk fase gerak masing-masing dengan konsentrasi 0,05 M untuk pH 4 dan 5 dan konsentrasi 0,1 M untuk pH 4 dan 5 sejumlah 400 mL. Larutan dapar asetat tersebut dibuat dari campuran natrium asetat dan asam asetat. Nilai pH larutan kemudian dikonfirmasi menggunakan pH meter. Penambahan asam asetat berfungsi untuk memperbaiki karakteristik puncak.

Preparasi Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan adalah kombinasi asetonitril: dapar asetat (20:80 v/v) sebanyak 500 mL dengan asetonitril 100 mL : dapar 400 mL. Larutan dicampurkan dalam gelas beker, kemudian divakum untuk menghilangkan partikel pengotor dan gelembung.

Optimalisasi KCKT

Optimasi KCKT dilakukan dengan menggunakan desain faktorial. Terdapat dua aras atau level, aras tinggi (+) dan aras rendah (-). Sehingga percobaan yang dilakukan yaitu 2^n , n adalah jumlah faktor, sehingga percobaan yang dilakukan $2^3 = 8$ kali percobaan.

Tabel 1. Hasil Desain Faktorial 2^3

Kombinasi percobaan	Variabel bebas		
	pH dapar	Konsentrasi dapar (M)	Laju alir (mL/menit)
1	4	0,05	0,5
2	4	0,05	1
3	4	0,1	0,5
4	4	0,1	1
5	5	0,05	0,5
6	5	0,05	1
7	5	0,1	0,5
8	5	0,1	1

Validasi Metode Selektivitas Pembuatan Larutan Standar

Larutan campuran yang mengandung ranitidin dan simetidin (masing-masing 40 ppm) serta asetosal (20 ppm) dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian diencerkan dengan metanol 20% hingga tanda batas.

Linearitas Pembuatan Larutan Baku

Kurva kalibrasi dibuat dengan mengencerkan larutan induk menggunakan metanol 20% dalam labu ukur 5 mL hingga diperoleh seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60 ppm. Sebelum diinjeksikan ke dalam sistem KCKT, setiap larutan campuran disaring menggunakan membran filler 0,45 μm dan dimasukkan ke dalam vial.

Pengukuran Area

Setelah seluruh larutan baku disiapkan. Fase gerak difiltrasi dengan menggunakan *vaccum filtration assembly* dengan membran *filter* 0,22 μm , kemudian dialirkan ke dalam sistem KCKT.

Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Pengujian LOD dan LOQ dilakukan dengan menggunakan plot kalibrasi pada analisis regresi linear pada uji linearitas.

Akurasi

Akurasi dilakukan dengan menentukan perolehan kembali (%*recovery*) dan metode *spike placebo recovery* pada larutan baku konsentrasi 80%, 100%, 120% dari konsentrasi

target (20 ppm), yang berturut-turut yaitu 16 ppm, 20 ppm, dan 24 ppm. Pengukuran dilakukan dengan replikasi injeksi sebanyak tiga kali untuk setiap konsentrasi sampel yang homogen. Larutan baku tersebut diinjeksikan ke dalam sistem KCKT untuk memperoleh data luas area puncak. Luas area tersebut digunakan untuk menghitung % *recovery*.

Presisi

Pengujian dilakukan dengan cara melakukan replikasi sebanyak enam kali pada sampel larutan campuran obat dengan konsentrasi 20 ppm. Selanjutnya, luas area puncak diukur menggunakan KCKT untuk menghitung nilai %RSD.

Rentang

Rentang atau kisaran dapat ditentukan dari uji akurasi, linearitas, dan presisi yaitu 10 – 60 ppm.

Analisis Data

Analisis data hasil optimasi dilakukan dengan mengevaluasi nilai resolusi (R_s) yang memenuhi persyaratan, menghitung faktor interaksi desain faktorial, serta menetapkan parameter validasi metode secara matematis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kondisi Optimasi

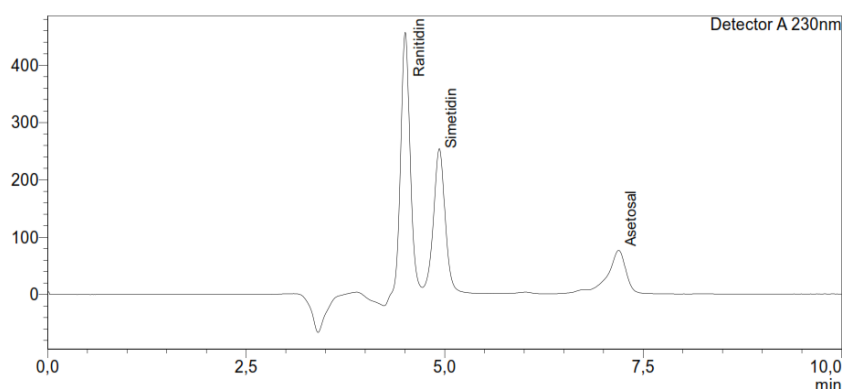
Pemisahan dengan KCKT ditentukan oleh distribusi dinamik analit antara fase gerak yang polar dan fase diam yang nonpolar. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril dan dapar asetat (20:80 v/v). Pemilihan dapar asetat didasarkan pada kapasitas penyangga yang optimal pada rentang pH 3,8-5,8 untuk menjaga konsistensi pH fase gerak selama elusi isokratik berlangsung serta kompatibilitasnya yang lebih baik untuk deteksi UV. Dapar asetat memiliki nilai pKa (4,76) yang baik untuk mengontrol pH fase gerak sehingga efektif dan optimal untuk pemisahan analit terionisasi pada rentang pH asam hingga netral pada kolom fase terbalik. Selain itu, dapar asetat termasuk dapar organik yang dapat memberikan hasil kontrol retensi analit yang baik dan konsisten tanpa mengotori sistem seperti dapar anorganik, dapat memberikan puncak yang tajam, dan mudah disiapkan dan dioptimalkan (SCION Instruments, 2024)

Interpretasi mekanisme analit tidak hanya didasarkan pada nilai pKa secara individu, sebab pKa merupakan indikator konstanta kesetimbangan ionisasi asam-basa molekul dan bukan untuk ukuran langsung dari polaritas suatu senyawa (Ermis et al., 2025). Polaritas dan

sifat hidrofobisitas intrinsik senyawa pada bentuk molekul netral ditunjukkan oleh nilai partisi oktanol-air ($\log P$), sedangkan kepolaran efektif pada pH fase gerak tertentu ditunjukkan oleh koefisien distribusi ($\log D$) dengan menghitung derajat ionisasi (α) (Ganesh et al., 2023). Ranitidin merupakan senyawa basa lemah dengan nilai pKa 2,7 (gugus furan) dan 8,2 (gugus amina teralifatik), serta nilai $\log P$ 0,3 (Kortejärvi et al., 2005). Simetidin juga merupakan basa lemah dengan nilai pKa 6,8 (gugus imidazol) dan $\log P$ 0,7 (Jantratid et al., 2006). Sedangkan asetosal merupakan monoprotik asam lemah dengan nilai pKa 3,49 dan nilai $\log P$ 1,18 (Dressman et al., 2012).

Urutan elusi dan retensi analit pada KCKT fase terbalik ditentukan oleh derajat hidrofobisitas relatif ($\log D$), interaksi analit dengan rantai alkil C18, interaksi sekunder dengan gugus silanol terdeprotonasi (SiO^-), serta fraksi pengubah organik dalam fase gerak (Ganesh et al., 2023). Senyawa yang berada dalam kondisi terionisasi tinggi pada pH fase gerak tertentu akan memiliki kepolaran efektif yang lebih tinggi ($\log D$ rendah), sehingga interaksi dengan fase diam C18 menjadi lebih lemah dan terelusi lebih cepat (Arayne et al., 2010). Sebaliknya, analit yang dominan berada dalam bentuk molekul tidak terionisasi (netral) memiliki lipofisitas yang lebih tinggi, sehingga tertahan lebih lama pada rantai alkil fase diam (Ganesh 2023). KCKT dengan sistem fase terbalik akan mengelusi zat yang paling polar untuk keluar terlebih dahulu. Semakin tinggi nilai pKa, semakin polar. Selain faktor pKa, nilai $\log P$ juga berpengaruh pada rasio distribusi senyawa pada pelarut yang polar atau nonpolar. Semakin kecil nilai $\log P$ maka hidrofilitas senyawa akan semakin tinggi (semakin polar). Berdasarkan nilai $\log P$ intrinsik molekul netral (ranitidin 0,3 < simetidin 0,7 < asetosal 1,18) serta perbedaan derajat ionisasi pada fase gerak, ranitidin terelusi lebih dahulu, diikuti simetidin, dan asetosal tertahan paling lama. Maknanya bahwa semakin polar senyawa obat maka akan lebih cepat terelusi.

Penentuan fase gerak pada pH 4 dan 5 dilakukan karena masuk dalam rentang pH fase gerak yang stabil untuk dapar asetat dan dipilih berdasarkan nilai pKa masing-masing obat dengan nilai pKa asetosal 3,49; simetidin 6,8; ranitidin 8,2. Hasil penetapan dapar asetat pada pH 5 berdasarkan karakteristik ionisasi spesifik masing-masing analit, kapasitas penyangga dapar asetat, retensi, simetrisnya bentuk puncak, resolusi (R_s), dan kompatibilitas kolom kromatografi (Ermis et al., 2025). Gambar kromatogram dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram dengan fase gerak pH 5; konsentrasi 0,05 M; dan laju alir 0,5 mL/menit

Pada kondisi pH 5, asetosal berada dalam bentuk anion karboksilat terionisasi, sedangkan simetidin dan ranitidin terprotonasi sebagai bentuk kation terionisasi (Dressman et al., 2012; Jantratid et al., 2006). Penggunaan pH 5 secara efektif memodulasi log D ketiga analit serta menekan interaksi sekunder yang tidak diinginkan antara kation ranitidin atau simetidin dengan gugus SiO^- pada permukaan stasioner silika (Ermis et al., 2025). Penambahan konsentrasi dapar asetat 0,05 M menyediakan *counter-ion* yang cukup untuk melapisi silanol bebas, sehingga mampu mengeliminasi efek pengekoran puncak dan menghasilkan bentuk puncak yang tajam dan simetris.

Parameter optimasi yang digunakan meliputi waktu retensi, jumlah pelat teoritis, *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP), dan resolusi yang dapat diamati pada Tabel 3. Berdasarkan nilai HETP dan jumlah plat teoritis (N-plat) pada kondisi optimasi terpilih, fase gerak asetonitril:dapar asetat pH 5, 0,05 M dengan laju alir 0,5 mL/menit memenuhi standar parameter dengan nilai N-plat >2000 dan HETP lebih kecil dari jumlah N-plat. Jumlah plat teoritis digunakan sebagai indikator efisiensi kolom dalam pemisahan senyawa pada analisis KCKT. Pada kondisi optimasi pada fase gerak pada dapar asetat pH 5 yang lain, meskipun pada puncak-puncaknya dominan menunjukkan hasil HETP lebih kecil daripada N-plat, terdapat nilai N-plat yang masih rendah. Nilai HETP merepresentasikan panjang kolom yang dibutuhkan untuk mencapai keseimbangan distribusi analit antara fase diam dan fase gerak selama proses kromatografi. Hal ini dapat menandakan efisiensi kolom yang buruk, puncak yang melebar, atau tumpang tindih. Efisiensi pemisahan kolom akan meningkat apabila nilai HETP lebih kecil, yang menandakan kinerja elusi yang lebih optimal (Nofita et al., 2018).

Tabel 2. Hasil optimasi sistem KCKT

Parameter Percobaan	Puncak	Rata-rata t_R	%RSD t_R	Rata-rata N-plat	Rata-rata HETP	Rata-rata resolusi
pH 4/0,05 M/ 0,5 mL/mnt	I	3,256	0,17%	373,333	543,058	0
	II	3,929	0,02%	1802,333	83,243	0,929

Parameter Percobaan	Puncak	Rata- rata t_R	%RSD t_R	Rata-rata N-plat	Rata-rata HETP	Rata-rata resolusi
	III	9,024	0,95%	866	174,522	0,531
pH 4/0,05 M/ 1,0 mL/mnt	I	3,415	0,72%	907,333	726,755	0,232
	II	3,945	0,03%	1421	105,877	1,212
	III	9,172	0,03%	334,5	549,172	0
pH 4/0,1 M/ 0,5 mL/mnt	I	3,549	0,28%	1297	116,166	0
	II	4,308	0,13%	3205	46,807	2,174
	III	9,336	0,16%	464,667	527,919	0,065
pH 4/0,1 M/ 1,0 mL/mnt	I	1,803	0,91%	663	230,082	0
	II	2,156	0,30%	837	182,179	1,218
	III	4,678	0,76%	5	31974,604	0,255
pH 5/0,05 M/ 0,5 mL/mnt	I	4,25	5,17%	4614,333	32,834	0
	II	4,661	5,05%	3307,333	45,778	1,509
	III	6,991	3,43%	3673,5	102,657	5,495
pH 5/0,05 M/ 1,0 mL/mnt	I	2,157	0,24%	1284,667	116,949	0,813
	II	2,371	0,15%	899	167,448	0,525
	III	3,087	0,23%	4	41134,696	0
pH 5/0,1 M/ 0,5 mL/mnt	I	7,756	0,94%	4343	34,547	1,073
	II	8,071	0,82%	2468,667	60,872	0,562
	III	0	0	0	0	0
pH 5/0,1 M/ 1,0 mL/mnt	I	3,833	0,11%	2845,667	52,734	0,989
	II	4,009	0,09%	558,333	271,364	0,364
	III	5,969	0,19%	602	249,332	2,371

Pada optimasi dengan fase gerak asetonitril:dapar asetat pH 4, 0,05 M, dengan laju alir 0,5 mL/menit ataupun 1 mL/menit, diperoleh HETP pada salah satu puncak melebihi N-plat, dan nilai N-plat yang dihasilkan <2000 pada seluruh kondisi optimasi dengan pH 4. Penyebab nilai HETP yang besar di antaranya dapat disebabkan oleh kerusakan kolom, baseline dengan noise tinggi, atau ketidakstabilan analit terhadap kondisi fase gerak tersebut.

Berdasarkan hasil optimasi terpilih, fase gerak asetonitril:dapar asetat pH 5, 0,05 M dengan laju alir 0,5 mL/menit diperoleh nilai resolusi yang baik 1,509 dan 5,495 yang memenuhi standar resolusi. Pada kondisi optimasi lain, nilai resolusi tidak memenuhi persyaratan sehingga tidak dapat dilanjutkan untuk analisis validasi metode. Resolusi yang buruk dapat disebabkan dari fase gerak yang tidak cocok baik dari segi pH, konsentrasi dapar yang tidak tepat atau dapat disebabkan penurunan efisiensi kolom, selektivitas rendah atau retensi yang tidak tepat (BenchChem Technical Support Team, 2025).

Interaksi Antar Faktor

Penelitian ini menggunakan desain faktorial 2^3 yang dilakukan dengan tiga kali replikasi dan dihitung nilai reratanya dalam menentukan percobaan yang akan dilakukan sehingga dapat memperhitungkan interaksi antara faktor. Dalam percobaan ini perlu adanya respons, yaitu resolusi (R_s) untuk menentukan hasil interaksi dari faktor-faktor yang

ditetapkan. Faktor-faktor dari variabel bebas yang memengaruhi, yaitu pH dapar (P), konsentrasi dapar (C), dan laju alir (A), ini dianalisis menggunakan rancangan faktorial dengan menghitung interaksi dari masing-masing faktor, interaksi dua faktor, dan interaksi tiga faktor. Respons yang digunakan dalam menetapkan faktor-faktor ini adalah nilai resolusi (Rs). Berdasarkan data eksperimen, dilakukan perhitungan kuantitatif terhadap estimasi efek utama, efek interaksi dua faktor (PC, CA, AP), serta efek interaksi tiga faktor (PCA) untuk mengukur besar dan arah pengaruh masing-masing parameter terhadap pemisahan. Adapun hasil dari faktor tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Interaksi Faktor dari Rancangan Desain Faktorial

Faktor	JK
P	0,762
C	-0,39544
A	-0,6685
PC	-0,5975
CA	0,77520
AP	-0,473
PCA	0,9395

Keterangan : P = pH dapar; C = konsentrasi dapar; A = laju alir; PC = pH dengan konsentrasi dapar; CA = konsentrasi dapar dengan laju alir; AP = laju alir dengan pH dapar; PCA = pH dan konsentrasi dapar dengan laju alir

Dari penentuan nilai interaksi antara faktor dilakukan perhitungan untuk menentukan jumlah kuadrat (JK). Jumlah kuadran ini bertujuan untuk mengukur variabilitas atau seberapa besar pengaruh suatu faktor terhadap hasil eksperimen. Nilai JK akan selalu positif dan berfungsi untuk mengukur besarnya variasi respons yang dijelaskan oleh faktor tersebut. Tanda positif (+) pada estimasi efek mengindikasikan arah pengaruh kromatografi. Nilai positif menunjukkan adanya peningkatan faktor yang akan meningkatkan resolusi, sedangkan tanda negatif menunjukkan adanya peningkatan faktor yang akan menurunkan resolusi. Jumlah JK yang besar memberikan banyak percobaan terhadap variasi respons resolusi.

Pada faktor atau pengaruh utama (P, C, dan A), nilai P menunjukkan bahwa peningkatan pH dari level bawah (pH 4) ke level pH tinggi (pH 55) mengalami peningkatan respons resolusi, sedangkan C dan A menunjukkan hasil yang negatif. Nilai ini menunjukkan bahwa peningkatan C ataupun A cenderung menurunkan nilai respons resolusi akibat peningkatan kecepatan linier fase gerak dan kompetisi ionik pada permukaan kolom C18. Nilai interaksi dari dua faktor memiliki pengaruh pada CA, yaitu efek konsentrasi (C) dan laju alir (A), dengan hasil yang positif memberikan makna bahwa CA berpengaruh terhadap respons, sedangkan PC dan AP mendapatkan hasil negatif sehingga dapat dikatakan tidak ada

pengaruh yang signifikan. Interaksi antara konsentrasi dengan laju alir cukup kuat untuk mempengaruhi konsentrasi terhadap respons resolusi.

Nilai interaksi tiga faktor (PCA) untuk mengetahui pengaruh P terhadap resolusi berubah secara bersamaan ketika C dan A juga berubah. Nilai PCA dihitung dari selisih rata-rata respons pada kombinasi level tinggi dan level rendah berdasarkan perkalian tanda P, C, dan A. Nilai yang diperoleh, meskipun kecil dan tidak negatif, menunjukkan bahwa perubahan pH, konsentrasi, dan laju alir pada penetapan secara simultan memberikan efek atau kontribusi terhadap variasi resolusi, sehingga sistem didominasi oleh efek utama (P,C,A).

Hasil desain faktorial menunjukkan bahwa pengaruh respons yang paling besar adalah P, CA, dan PCA. Artinya dengan nilai PCA 0,9395 dapat memberikan pengaruh pada sistem dan hasil KCKT. Dalam interaksi faktor-faktor tersebut faktor P paling berpengaruh terhadap sistem kromatografi yang dianalisis.

Validasi Metode

Validasi metode merupakan rangkaian tindakan terencana dan terdokumentasi yang bertujuan untuk membuktikan secara objektif pada suatu metode analisis konsisten, akurat, tepat, selektif, peka, dan andal untuk penggunaan secara berulang, sehingga validasi ini dapat dipercaya dan dipertanggungjawabkan. Parameter yang digunakan dalam validasi metode sesuai dengan ketentuan Farmakope Indonesia meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, presisi, dan rentang. Pada penelitian ini metode yang dikembangkan memenuhi seluruh parameter validasi, sehingga metode ini dapat digunakan sebagai metode analisis yang tervalidasi. Berdasarkan hasil validasi, metode tersebut menunjukkan hasil yang memenuhi kriteria. Hasil validasi metode dapat dilihat pada tabel 5 berikut ini:

Tabel 4. Hasil Parameter Validasi

Parameter	Hasil
Selektivitas (nilai resolusi)	1,509 dan 5,495
Linearitas (R)	0,9989; 0,9989; 0,9992
Batas deteksi (LOD)	2,59 ppm
Batas kuantifikasi (LOQ)	8,64 ppm
Akurasi (%Recovery)	103,863%
Presisi (%RSD)	1,819%

1. Selektivitas

Uji selektivitas bertujuan untuk mendapatkan pemisahan larutan campuran yang berisi analit ranitidin, simetidin, dan asetosal. Selektivitas berkaitan dengan nilai resolusi (Rs). Nilai resolusi yang baik yaitu >1,5 untuk menunjukkan pemisahan yang optimal antar senyawa (Departemen Kesehatan, 2020). Nilai resolusi yang dihasilkan untuk puncak pertama dengan

puncak kedua adalah 1,509 dan nilai resolusi puncak kedua dengan puncak ketiga adalah 5,495.

Nilai selektivitas juga dapat ditentukan dari rasio perbandingan faktor kapasitas dari senyawa yang berbeda. Faktor kapasitas diukur dengan waktu retensi puncak dikurangi waktu mati. Nilai selektivitas (α) harus >1 agar terjadi pemisahan yang sempurna (Scientific, 2020). Pada penelitian ini diperoleh nilai α_1 yaitu 1,319 dan α_2 yaitu 2,274, sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan antara resolusi dan nilai selektivitas memenuhi syarat. Maknanya, semakin besar nilai yang diperoleh, maka hasil pemisahan yang dilakukan semakin baik dalam memisahkan senyawa yang berbeda dengan puncak yang tidak berdekatan.

2. Linieritas (R)

Linieritas bertujuan untuk menentukan hubungan antara konsentrasi dan luas area dengan membuat kurva standar dari ranitidin, simetidin, dan asetosal yang diuji menggunakan kondisi KCKT terpilih. Seri konsentrasi merupakan nilai rentang sebagai interval batas tertinggi dan batas terendah dari kadar analit. Berikut adalah hasil linieritas senyawa pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Linieritas Ranitidin, Simetidin, dan Asetosal

Konsentrasi (ppm)	Area Ranitidin	Area Simetidin	Area Asetosal
10	81925410	30804855	21829189
20	85943429	36461349	24523966
30	89421858	41894843	27854256
40	92908153	46631007	30810727
50	97031339	53632356	33839439
60	99783315	59140415	36294252
Regresi linear	$y = 360113x + 78564962$	$y = 565506x + 24968106$	$y = 294938x + 18869151$
R^2/r	0,998 / 0,9989	0,9979 / 0,9989	0,9985 / 0,9992

Linieritas menunjukkan bahwa konsentrasi dan area berbanding lurus, artinya semakin tinggi konsentrasi, maka semakin tinggi area yang dihasilkan. Pada ketiga kurva menunjukkan garis lurus ke atas dan hasil yang diperoleh masuk kedalam syarat nilai korelasi (R) yang baik $> 0,997$ atau mendekati 1 (Departemen Kesehatan, 2020).

3. Batas deteksi dan batas kuantifikasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) ditentukan untuk mengetahui batas konsentrasi analit yang dapat dideteksi dan untuk mengetahui batas konsentrasi analit yang dapat terkuantifikasi oleh alat. Hasil LOD dan LOQ dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi Masing-Masing Analit

	Ranitidin	Simetidin	Asetosal
LOD (ppm)	2,52	2,59	2,15
LOQ (ppm)	8,41	8,64	7,15

Berdasarkan Tabel 6, jika larutan campuran diujikan, maka dapat dideteksi dengan nilai minimum 2,59 ppm dan dapat dikuantifikasi dengan nilai minimum 8,64 ppm. Nilai tersebut dapat memenuhi syarat karena nilai yang dihasilkan berada di bawah rentang yang dianalisis. Semakin tinggi nilai LOD dan LOD, maka metode semakin sensitif.

4. Akurasi

Akurasi pada penelitian ini menggunakan metode simulasi pada larutan campuran ranitidin, simetidin, dan asetosal sebesar 80%, 100% dan 120% dari masing-masing 20 ppm baku obat. Berdasarkan hasil pengujian akurasi nilai % *recovery* yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 7. Hasil tersebut memenuhi standar Farmakope Indonesia Edisi VI 80–120% dari kadar analit.

Tabel 7. %Recovery Masing-Masing Analit

	Ranitidin	Simetidin	Asetosal	Rata-rata
%Recovery	108,158%	100,708%	102,724%	103,863%

5. Presisi

Uji presisi dilakukan dengan menggunakan enam kali replikasi dalam satu waktu. Berdasarkan hasil pengujian nilai %RSD yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 8. Nilai presisi memenuhi standar yaitu < 2% dari 5–6 kali replikasi. (Departemen Kesehatan, 2020).

Tabel 8. Data %RSD dari Masing-Masing Analit

	Ranitidin	Simetidin	Asetosal	Rata-rata
%RSD	1,904%	1,835%	1,717%	1,819%

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa kondisi kromatografi yang tepat untuk analisis ranitidin, simetidin, dan asetosal adalah menggunakan sistem KCKT dengan detektor UV pada panjang gelombang 230 nm, laju alir 0,5 mL/menit, menggunakan elusi isokratik dengan komposisi fase gerak asetonitril:dapar asetat 0,05 M, pH 5.

Hasil masing-masing kriteria validasi tersebut memenuhi standar validasi. Nilai linearitas ranitidin 0,9989; simetidin 0,9989; dan asetosal 0,9992. Nilai LOD untuk ranitidin, simetidin, dan asetosal adalah 2,52 ppm; 2,59 ppm; dan 2,15 ppm. Sedangkan nilai LOQ untuk

ranitidin, simetidin, dan asetosal adalah 8,41 ppm; 8,64 ppm; dan 7,15 ppm. Nilai rata-rata akurasi 103,863%, dan nilai rata-rata RSD presisi 1,819%.

Penelitian selanjutnya dapat dikembangkan untuk menetapkan kadar ranitidin dan simetidin dengan adanya penambahan asetosal, serta memperhatikan faktor puncak dan waktu pencampuran obat sebagai unsur keterbaruan. Penggunaan *software Design Expert* sangat disarankan untuk memudahkan dan meminimalkan kegagalan dalam penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arayne, M. S., Sultana, N., Zuberi, M. H., & Siddiqui, F. A. (2010). Simultaneous Determination of Metformin, Cimetidine, Famotidine, and Ranitidine in Human Serum and Dosage Formulations Using HPLC with UV Detection. *Journal of Chromatographic Science*, 48(9), 721–725. <https://doi.org/10.1093/chromsci/48.9.721>
- Ashiru, D. A. I., Patel, R., & Basit, A. W. (2007). Simple and Universal HPLC-UV Method to Determine Cimetidine, Ranitidine, Famotidine and Nizatidine in Urine: Application to The Analysis of Ranitidine and Its Metabolites in Human Volunteers. *Journal of Chromatography B*, 860, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.10.029>
- BenchChem Technical Support Team. (2025). Troubleshooting Poor Peak Resolution in HPLC Analysis of Rivastigmine Tartrate. *BenchChem, Trobleshooting & Optimization*, 1–9.
- Bolton, S. (1997). Factorial Designs in Pharmaceutical Stability Studies. *C*, 362–366.
- Departemen Kesehatan. (2020). Farmakope Indonesia Edisi VI. In *Kementerian Kesehatan RI (VI)*. Kementerian Kesehatan RI.
- DiPiro, J. T., Yee, G. C., Posey, L. M., Haines, S. T., Nolin, T. D., & Ellingrod, V. (2020). *Pharmacotherapy: A Pathphysiologic Approach* (Eleventh). Mc Graw Hill.
- Dressman, J. B., Nair, A., Abrahamsson, B., Barends, D. M., Groot, D. W., Kopp, S., Langguth, P., Polli, J. E., Shah, V. P., & Zimmer, M. (2012). Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Acetylsalicylic Acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(8), 2653–2667. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Ermis, M., Kir, F., & Sahin, S. (2025). Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous determination of cimetidine, metoprolol tartrate and phenol red for intestinal perfusion studies. *Journal Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1, 1252. doi: 10.1016/j.jchromb.2025.124449
- Ganesh, V., Basuri, P. P., Sahini, K., & Nalini, C. N. (2023). Retention Behaviour of Analytes in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography*, 33(e5482), 1–15. <https://doi.org/10.1002/bmc.5482>
- Jantratid, E., Prakongpan, S., Dressman, J. B., Amidon, G. L., & Junginger, H. E. (2006).

- Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms : Cimetidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(5), 974–984. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Kortejärvi, H., Yliperttula, M., Dressman, J. B., Junginger, H. E., Midha, K. K., Shah, V. P., & Barends, D. M. (2005). Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ranitidine Hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(8), 1617–1625. <https://doi.org/10.1002/jps.20392>
- Kowalska, M., Woźniak, M., Kijek, M., & Mitrosz, P. (2022). Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. *Scientific Reports*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99269-x>
- Nofita, Dayanti, R., Tutik, & Supardi. (2018). Penetapan Kondisi Optimum Pengujian Kadar Parasetamol dan Kafein dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Farmasi Malahayati*, 1(2), 96–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.33024/jfm.v1i2.1242>
- Nugent, C. C., Falkson, S. R., & Terrell, J. M. (2022). H2 Blockers. In *StatPearls*. StatPearls. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525994/>
- Patel, M. S., Patel, C. N., & Patel, V. B. (2013). Stability-indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Aspirin and Prasugrel. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4), 413–419. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.119816>
- Scientific, C. (2020). The Theory of HPLC Chromatographic Parameters. *Cromacademy*.
- SCION Instruments. (2024). *What Even is a Buffer? Mobile Phase Considerations*. SCION Instruments. <https://doi.org/https://www.chromatographyonline.com/view/lcgc-blog-uv-detection-hplc-fundamental-principle-practical-implications-0>
- Siswanto, A., Fudholi, A., Nugroho, A. K., & Martono, S. (2016). Validasi Metode HPLC untuk Penetapan Aspirin dan Asam Salisilat dalam Plasma Kelinci (*Lepus curpaeums*) secara Simultan Validation of A High Performance Liquid Chromatography Method for The Simultaneous Determination of Aspirin and Salicylic Acid In Rabb. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 6(2), 68–78. e-issn: 2354-8770
- Skibinski, R., & Komsta, L. (2016). The Stability and Degradation Kinetics of Acetylsalicylic Acid in Different Organic Solutions Revisited – an UHPLC – ESI-QTOF Spectrometry Study. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 29(1), 39–41. <https://doi.org/10.1515/cipms-2016-0009>