

Penetapan Kadar L-Histidine HCl, L-Arginine HCl, Glycine, dan Threonine dalam Formulasi Sediaan Steril Skala Laboratorium Menggunakan Metode UPLC

Quantitative Determination of L-Histidine HCl, L-Arginine HCl, Glycine, and Threonine in a Laboratory-Scale Sterile Formulation by UPLC

Bagus Ovi Pratama^{1*}, Yuni Retnaningtyas², Dian Agung Pangaribowo³, Moch Amrun Hidayat⁴, Yudi Wicaksono⁵

^{1,2,3,4,5}Faculty of Pharmacy, University of Jember, Jember 68121, Indonesia
Email: yuniretnaningtyas@unej.ac.id, bagusovipratama@gmail.com

Abstract

Background: Establishing dependable analytical procedures is crucial for maintaining the quality of amino acid-based sterile formulations, particularly during early-stage development. **Objective:** This study describes the development and validation of an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for the concurrent determination of L-Histidine HCl, L-Arginine HCl, Glycine, and Threonine in laboratory-scale preparations. **Methods:** The chromatographic system was optimized to produce distinct and symmetrical peaks, ensuring adequate resolution without interference from formulation components, solvents, or possible impurities. Validation of the proposed method was carried out based on widely accepted analytical criteria, including linearity, precision, accuracy, and assay evaluation. **Result:** The calibration curves exhibited strong linear relationships within the studied concentration ranges, with correlation coefficients (r) exceeding 0.98 for all compounds. Repeatability was demonstrated by relative standard deviation (RSD) values below 2%, indicating consistent analytical performance. Accuracy assessment through recovery experiments produced values approaching 100%, confirming the method's reliability. Furthermore, assay results for each analyte were within the predefined acceptance range of 90%–110%. The analysis was completed within approximately 7 minutes, demonstrating the method's efficiency for routine laboratory use. **Conclusion:** In summary, the developed UPLC method is precise, accurate, and suitable for simultaneous amino acid quantification in sterile formulation studies and quality control applications.

Keywords: UPLC; amino acids; sterile formulation; laboratory scale, method validation; quantitative determination

1. PENDAHULUAN

Tahap awal pengembangan sediaan farmasi, khususnya larutan injeksi steril yang mengandung asam amino, menuntut evaluasi kualitas secara akurat pada skala laboratorium (1,2). Penetapan kadar komponen aktif pada tahap formulasi awal sangat penting untuk menilai kompatibilitas senyawa, stabilitas larutan, serta kesesuaian dengan persyaratan mutu yang diharapkan (2–4). Selain itu, pada sediaan parenteral, ketepatan kadar komponen sangat krusial karena berkaitan langsung dengan keamanan, efektivitas terapi, serta stabilitas produk selama penyimpanan. Pada tahap ini, data yang akurat dan cepat menjadi dasar dalam pengambilan keputusan untuk optimasi formula sebelum dilakukan pengembangan skala lebih besar (4,5).

L-Histidine HCl, L-Arginine HCl, Glycine, dan Threonine merupakan asam amino penting yang sering digunakan dalam formulasi nutrisi parenteral (6–9). Senyawa ini memiliki gugus amina ($-NH_2$) dan karboksilat

*Corresponding author: Yuni Retnaningtyas, Universitas Jember, Jember, Indonesia.

E-mail : yuniretnaningtyas@unej.ac.id

Doi : 10.35451/yne6a973

Received : February 21, 2026, Accepted: April 11, 2026 , Published: April 30, 2026

Copyright: © 2026 Yuni Retnaningtyas (s). Creative Commons License This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

(-COOH) yang spesifik, sehingga memerlukan metode analisis yang mampu membedakan dan mengukur tiap komponen secara tepat meskipun dalam larutan campuran kompleks (10–12). Karakteristik kimia asam amino yang polar serta kemiripan struktur antar senyawa sering menjadi tantangan dalam analisis simultan, sehingga diperlukan metode dengan selektivitas dan resolusi tinggi (9,10).

Metode analisis yang cepat dan andal sangat dibutuhkan pada tahap formulasi laboratorium (13). *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)* menawarkan keunggulan dalam hal kecepatan, presisi, dan resolusi dibandingkan teknik kromatografi konvensional (14–17). Dengan UPLC, beberapa asam amino dapat dianalisis secara simultan dengan konsumsi fase gerak lebih rendah dan waktu analisis lebih singkat, yang memudahkan proses evaluasi formula skala laboratorium (17–20). Meskipun berbagai metode penetapan asam amino telah dilaporkan, sebagian besar metode tersebut memerlukan prosedur derivatisasi yang kompleks, waktu analisis yang relatif lama, atau belum secara khusus dioptimalkan untuk sediaan injeksi steril, sehingga kurang efisien untuk evaluasi formulasi pada tahap awal pengembangan (16).

Saat ini, monografi khusus untuk sediaan injeksi asam amino belum tersedia di Farmakope Indonesia, sehingga pengembangan dan validasi metode internal menjadi langkah penting untuk memastikan data analisis yang andal (21,22). Validasi metode pada tahap ini bertujuan untuk menjamin bahwa metode yang diterapkan mampu memberikan hasil konsisten, tepat, dan dapat dipertanggungjawabkan, mendukung pengembangan formula yang lebih optimal pada tahap selanjutnya (23). Penelitian ini difokuskan pada pengembangan dan validasi metode UPLC untuk penetapan kadar L-Histidine HCl, L-Arginine HCl, Glycine, dan Threonine dalam larutan injeksi steril skala laboratorium. Metode ini diharapkan menjadi alat evaluasi awal yang efisien, akurat, dan praktis untuk mendukung proses formulasi dan pengembangan sediaan injeksi berbasis asam amino.

2. METODE

Bahan

Penelitian ini menggunakan standar asam amino L-Arginine HCl, L-Histidine HCl·H₂O, Glycine, dan Threonine (Fujifilm Wako) sebagai analit utama. Untuk derivatisasi dan penentuan kadar dengan UPLC digunakan *AccQTag Ultra Reagent* dan *internal standard* Norvaline (Waters), serta Reagent 2A (*AQC derivatizing reagent*) dengan Reagent 2B (acetonitrile) sebagai pelarut. Buffer borat pH 8,8, HCl 1N, dan *Water for Injection* digunakan untuk persiapan dan pengenceran sampel. Sampel yang dianalisis adalah larutan injeksi campuran keempat asam amino pada skala laboratorium, diproses untuk memastikan akurasi, presisi, dan konsistensi hasil analisis.

Alat

Peralatan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ACQUITY UPLC H-Class dengan detektor PDA (Waters) untuk analisis kromatografi presisi tinggi, *Andrew Alliance Pipetting Robot* (Waters) untuk penanganan sampel yang akurat dan konsisten, serta filter membran PTFE 0,2 µm (PALL Corp.) untuk filtrasi sampel sebelum analisis guna memastikan keakuratan dan reproducibility hasil penetapan kadar L-Histidine HCl, L-Arginine HCl, Glycine, dan Threonine.

Prosedur

Pembuatan Reagen

Larutan baku standar disiapkan dengan menimbang masing-masing standar asam amino sesuai proporsi formulasi laboratorium L-Arginine HCl (0,2700% b/v), L-Histidine HCl·H₂O (0,1300% b/v), L-Threonine (0,1800% b/v), dan Glycine (0,3400% b/v), kemudian dilarutkan dalam HCl 1N dan ditambahkan *Water for Injection* hingga mencapai volume dan konsentrasi sesuai produk. Larutan ini disaring menggunakan membran 0,22 µm untuk memastikan kejernihan (24).

Larutan internal standar Norvaline dibuat dengan konsentrasi 250 µM menggunakan HCl 0,1 M dan disaring sebelum digunakan. Untuk derivatisasi, *AccQ-Tag Ultra Reagent 2A* dicampur dengan Reagen 2B, dipanaskan pada suhu 55°C selama 15 menit, dicampur hingga homogen, dan disaring dengan membran 0,22 µm. Buffer borat pH 8,8 disiapkan dari kit derivatisasi dengan penambahan NaOH dan *Water for Injection*, diaduk hingga

homogen, kemudian disaring. Fase gerak yang digunakan terdiri dari Reagen 2A dan 2B siap pakai (*Ready-to-Use*) untuk analisis UPLC.

Penentuan Parameter Validasi Metode Analisis

Validasi metode dilakukan sesuai pedoman Farmakope Indonesia edisi VI (2020) dan ICH Q2 (R2), mencakup *system suitability*, spesifisitas, linieritas, presisi, dan akurasi (25). Uji *system suitability* dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar baku induk sebanyak enam kali dan menghitung rasio area puncak tiap asam amino terhadap internal standar Norvaline. Nilai relative standard deviation (RSD) rasio area puncak masing-masing analit harus kurang dari 2% (23)

Spesifisitas diuji dengan menyiapkan larutan asam amino yang telah dibuat dengan pelarut WFI untuk skala lab dengan konsentrasi L-Arginine HCl (0,2700% b/v), L-Histidine HCl·H₂O (0,1300% b/v), L-Threonine (0,1800% b/v), dan Glycine (0,3400% b/v). Larutan dicampur dengan internal standar Norvaline, buffer borat, dan reagen AccQTag Ultra, kemudian dipanaskan pada 55°C selama 10 menit, diaduk hingga homogen, dan dianalisis menggunakan UPLC. Metode dianggap spesifik jika kromatogram tidak menunjukkan puncak interferensi pada puncak analit target.

Linieritas diuji melalui pengenceran bertingkat larutan standar induk (80 - 120% dari konsentrasi uji) dengan prosedur derivatisasi dan analisis yang sama. Nilai koefisien korelasi (r) dari rasio area terhadap konsentrasi harus $\geq 0,98$ untuk memenuhi kriteria linieritas.

Presisi dinilai melalui pengulangan pengujian larutan standar enam kali, dengan RSD < 2% sebagai batas keberterimaan. Akurasi ditentukan menggunakan metode spike plasebo, dengan penambahan standar asam amino ke dalam WFI sebagai sampel plasebo pada konsentrasi 80, 100, dan 120%, dianalisis menggunakan prosedur UPLC, dengan kriteria % *recovery* 97–103%.

Penentuan Kadar Asam Amino dalam Sampel

Untuk penentuan kadar, larutan produk skala lab dipipet ke dalam collection *plate* dan dicampur dengan WFI, HCl 1N, dan internal standar Norvaline. Larutan ini kemudian dicampur dengan buffer borat dan reagen AccQTag Ultra, dipanaskan pada 55°C, dan diaduk hingga homogen sebelum ditempatkan pada PCR *plate* untuk analisis UPLC. Perhitungan kadar tiap asam amino dilakukan dengan membandingkan rasio luas area sampel dengan luas area internal standar sesuai persamaan:

$$\text{Jumlah } \left(\% \frac{w}{v} \right) \text{ untuk masing – masing asam amino} = W_s \times \left(\frac{Q_S}{Q_T} \right)$$

$$\text{Jumlah } (\%) \text{ untuk masing – masing asam amino} = \frac{Q_S}{Q_T} \times 100\%.$$

Keterangan :

W_s = Jumlah (g) dari masing-masing asam amino seperti yang ditunjukkan dalam metode preparasi untuk larutan standar asam amino.

Q_T = Rasio area untuk sampel.

Q_s = Rasio area untuk standar.

3. HASIL

Hasil Uji *System suitability Test* (SST)

Uji kesesuaian sistem merupakan tahap penting untuk memastikan bahwa sistem UPLC yang digunakan mampu menghasilkan data yang akurat, presisi, dan konsisten (23). Hasil uji SST larutan standar yang mengandung 4 asam amino L-Histidine HCl, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji SST

Analit	Waktu retensi (menit, <i>mean</i> ± <i>SD</i>)	%RSD Waktu retensi
L-Histidine HCl.H ₂ O	3,256 ± 0,009	0,274
L-Arginine HCl	4,628 ± 0,008	0,180
Glycine	4,902 ± 0,008	0,160
L-Threonine	6,600 ± 0,008	0,114

Hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai RSD untuk waktu retensi tiap analit sangat rendah, berkisar antara 0,114-0,274%. Nilai-nilai ini berada jauh di bawah batas maksimum 2% yang ditetapkan oleh pedoman internasional seperti USP dan ICH, menunjukkan bahwa sistem analitik memiliki presisi tinggi dan elusi yang stabil. Waktu retensi teramati mulai dari 3,256 menit untuk L-Histidine HCl·H₂O hingga 6,600 menit untuk L-Threonine, mencerminkan pemisahan yang memadai antar komponen. Jarak elusi yang cukup antar puncak mendukung resolusi yang baik dan meminimalkan risiko tumpang tindih antara analit.

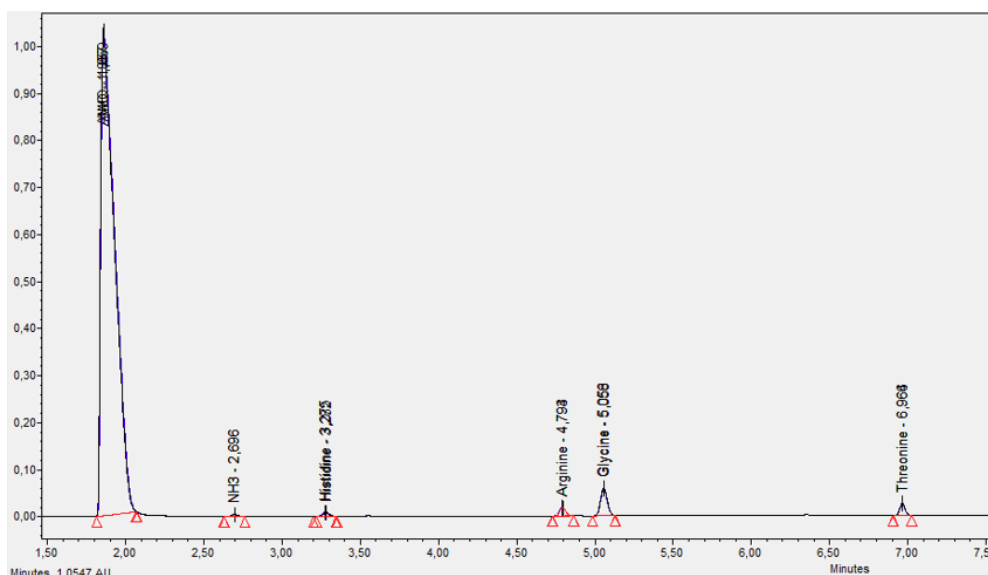
Berdasarkan hasil ini, sistem UPLC yang digunakan telah memenuhi kriteria kesesuaian sistem untuk analisis kuantitatif campuran keempat asam amino pada sediaan injeksi steril.

Hasil Uji Spesifisitas

Spesifisitas merupakan parameter penting dalam validasi metode kromatografi yang menilai kemampuan metode untuk secara selektif mendeteksi analit target di tengah matriks kompleks. Evaluasi difokuskan pada kemungkinan adanya interferensi dari pelarut atau komponen lain terhadap sinyal analit (26). Hasil uji spesifisitas yang dibuktikan dengan nilai resolusi yang dilakukan pada empat asam amino L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine ditunjukkan pada tabel 2, *Overlay* kromatogram antara standar dan sampel asam amino ditunjukkan pada gambar 1.

Tabel 2. Hasil Uji Resolusi

Pasangan analit (puncak yang berdekatan)	Resolusi (Rs)
L-Histidine HCl·H ₂ O / L-Arginine HCl	3,85
L-Arginine HCl / Glycine	2,67
Glycine / L-Threonine	4,20



Gambar. 1. *Overlay* kromatogram standar dan sampel 4 asam amino

Hasil pengujian menunjukkan bahwa masing-masing analit memberikan puncak yang jelas, simetris, dan tajam tanpa adanya indikasi *co-elution* atau puncak tambahan yang mengganggu. Injeksi blanko *Water for Injection*

(WFI) memperkuat temuan ini, karena tidak terlihat sinyal pada waktu retensi yang bersinggungan dengan puncak analit, sehingga sistem terbebas dari gangguan *carry-over*.

Overlay kromatogram standar dan sampel menunjukkan kesesuaian waktu retensi dan bentuk puncak yang sangat baik untuk keempat analit, mengindikasikan kemampuan metode untuk membedakan setiap komponen meski berada dalam matriks kompleks seperti sediaan injeksi steril. Evaluasi resolusi antar puncak analit juga menunjukkan nilai $R_s > 2,0$, ditunjukkan pada tabel 2 menandakan pemisahan yang memadai sesuai pedoman ICH Q2(R2). Secara spesifik, resolusi antara L-Histidine HCl·H₂O dan L-Arginine HCl tercatat 3,85, L-Arginine HCl dan Glycine 2,67, serta Glycine dan L-Threonine 4,20, menegaskan bahwa masing-masing analit terpisah dengan baik.

Dengan demikian, metode UPLC yang dikembangkan telah memenuhi kriteria spesifisitas. Keempat asam amino dapat diukur secara selektif tanpa interferensi dari komponen matriks atau pelarut, sehingga metode ini layak untuk dilanjutkan ke pengujian parameter validasi berikutnya.

Uji Linieritas

Uji linieritas dilakukan untuk menilai kemampuan metode UPLC dalam menghasilkan respons yang sebanding dengan konsentrasi analit. Fokus penelitian ini adalah empat asam amino L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine dalam rentang konsentrasi 80% hingga 120% dari kadar nominal produk injeksi steril. Setiap level konsentrasi diuji dalam tiga kali replikasi untuk memastikan keandalan data. Hasil uji linieritas ditampilkan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Linieritas

Analit	Persamaan regresi ($y = ax + b$)	R
L-Histidine HCl·H ₂ O	$Y = 0,0191x + 0,1314$	0,9972
L-Arginine HCl	$Y = 0,0385x + 0,2775$	0,9955
Glycine	$Y = 0,1425x + 0,7019$	0,9953
L-Threonine	$Y = 0,0465x + 0,4220$	0,9959

Hasil pengujian menunjukkan hubungan linier yang baik antara konsentrasi dan luas puncak kromatogram untuk keempat analit. Koefisien korelasi (r) yang diperoleh ditunjukkan pada tabel 3 berkisar antara 0,9953 hingga 0,9972, menunjukkan korelasi yang sangat tinggi. Selain itu, %RSD dari faktor respons antar replikasi berada di bawah 2%, menegaskan presisi dan konsistensi metode dalam rentang konsentrasi yang diuji.

Hasil ini mengindikasikan bahwa metode UPLC mampu mendeteksi perubahan konsentrasi dengan akurat dan proporsional, sehingga kuantifikasi keempat analit dapat dilakukan secara andal.

Uji Presisi

Presisi merupakan indikator penting dalam validasi metode analitik, yang menilai konsistensi hasil pengukuran pada kondisi eksperimental yang sama. Parameter yang dianalisis adalah Relative Standard Deviation (RSD) dari luas puncak kromatogram masing-masing analit. Hasil pengujian presisi asam amino L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine ditunjukkan pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Presisi

Analit	Rata-rata Kadar Analit (%)	%RSD
L-Histidine HCl·H ₂ O	98,98	0,55
L-Arginine HCl	101,75	0,52
Glycine	99,62	0,55
L-Threonine	101,63	0,46

Hasil pengujian parameter presisi pada tabel 4 menunjukkan bahwa keempat analit memiliki RSD di bawah 1%, dengan nilai spesifik sebagai berikut: L-Histidine HCl·H₂O 0,55%, L-Arginine HCl 0,52%, Glycine 0,55%, dan L-Threonine 0,46%.

Nilai %RSD yang rendah ini menegaskan bahwa metode UPLC yang dikembangkan mampu menghasilkan data yang sangat konsisten, memenuhi batas presisi $\leq 2\%$ yang disyaratkan oleh pedoman ICH Q2(R2) dan USP. Presisi yang baik ini tidak hanya mencerminkan kestabilan instrumen dan reagen, tetapi juga menandakan reproducibility metode dalam pengujian kuantitatif rutin.

Hasil Uji Akurasi

Akurasi merupakan parameter penting dalam validasi metode analisis, yang menunjukkan seberapa dekat hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya dari analit yang diuji. Hasil pengujian akurasi asam amino L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Akurasi Metode UPLC Pada Penetapan Kadar Asam Amino L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine

Analit	Spiked level (% of nominal)	mean recovery (%) ± SD
L-Histidine HCl.H ₂ O	80	100,03 ± 0,86
	100	98,93 ± 0,99
	120	100,10 ± 0,61
L-Arginine HCl	80	99,83 ± 0,90
	100	99,27 ± 0,86
	120	100,40 ± 0,62
Glycine	80	100,03 ± 0,67
	100	99,03 ± 0,82
	120	100,03 ± 0,76
L-Threonine	80	99,90 ± 0,52
	100	99,23 ± 0,57
	120	100,20 ± 0,70

Hasil pengujian menunjukkan bahwa persentase pemulihan (% recovery) untuk seluruh analit berada dalam kisaran 97% hingga 103%. Secara spesifik, L-Histidine HCl·H₂O memiliki recovery 98,93–100,10%, L-Arginine HCl 99,27–100,40%, Glycine 99,03–100,03%, dan L-Threonine 99,23–100,20%. Angka ini memenuhi batas penerimaan akurasi menurut pedoman ICH Q2(R1), menunjukkan bahwa metode mampu mengukur analit dengan tepat tanpa dipengaruhi matriks sampel atau komponen lain dalam formulasi.

Tingginya nilai recovery yang konsisten menegaskan bahwa metode UPLC yang dikembangkan memiliki keandalan tinggi untuk penetapan kadar kuantitatif semua asam amino dalam sediaan injeksi steril. Keakuratan ini juga mencerminkan efisiensi proses derivatisasi, ekstraksi, serta performa detektor yang mampu mendeteksi dan mengukur setiap analit secara selektif.

Analisis Kuantitatif Empat Asam Amino dalam Formulasi Skala Laboratorium

Metode UPLC yang telah tervalidasi diterapkan untuk penentuan kadar empat asam amino utama dalam sediaan injeksi steril, yaitu L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine. Pengukuran dilakukan dengan tiga kali pengulangan (n = 3) untuk setiap sampel. Hasil analisis kuantitatif 4 asam amino L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine ditunjukkan pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Kuantifikasi Analit Dalam Sampel Nyata

Analit	Klaim (mg/mL)	UPLC (mean ± SD, n=3)	UPLC (% dari klaim)
L-Histidine HCl.H ₂ O	1,33	1,32 ± 0,005	99,07
L-Arginine HCl	2,76	2,81 ± 0,01	101,87
Glycine	3,47	3,46 ± 0,01	99,73
L-Threonine	1,84	1,87 ± 0,01	101,77

Hasil analisis pada tabel 6 menunjukkan bahwa konsentrasi masing-masing analit berada sangat dekat dengan klaim label, dengan persentase terhadap nilai klaim sebagai berikut: L-Histidine HCl·H₂O 99,07%, L-Arginine HCl 101,87%, Glycine 99,73%, dan L-Threonine 101,77%. Semua nilai berada dalam rentang spesifikasi produk, yaitu 90%–110%, yang menegaskan akurasi metode dalam matriks injeksi steril.

Kromatogram UPLC memperlihatkan puncak yang tajam dan simetris untuk keempat analit, tanpa adanya gangguan dari eksipien atau komponen lain. Waktu retensi teramati berkisar dari 3,25 menit untuk L-Histidine HCl·H₂O hingga 6,60 menit untuk L-Threonine, sehingga seluruh analisis selesai dalam kurang dari 7 menit. Variasi antar pengulangan sangat rendah, dengan %RSD <1%, menunjukkan presisi yang tinggi dari metode ini. Temuan ini menegaskan bahwa metode UPLC yang dikembangkan mampu melakukan kuantifikasi cepat, akurat, dan presisi terhadap L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine.

4. PEMBAHASAN

Metode UPLC yang dikembangkan dalam penelitian ini menunjukkan kinerja yang andal untuk penetapan kadar L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine dalam formulasi injeksi steril skala laboratorium. Hasil uji kesesuaian sistem menunjukkan stabilitas waktu retensi dan konsistensi rasio area puncak dengan nilai relative standard deviation (RSD) di bawah 1%, yang mengindikasikan variabilitas analitik yang minimal serta reproduktibilitas instrumen yang tinggi. Variabilitas yang rendah ini mencerminkan kondisi kromatografi yang stabil dan pengendalian parameter eksperimental yang memadai, yang merupakan aspek penting dalam analisis kuantitatif formulasi multikomponen. Spesifisitas metode juga terbukti baik, ditunjukkan dengan tidak adanya interferensi dari matriks maupun eksipien serta resolusi antar puncak yang memadai, sehingga setiap analit dapat diidentifikasi dan dikuantifikasi secara selektif dalam campuran kompleks. Pemisahan yang selektif ini menjadi sangat penting terutama untuk senyawa asam amino yang memiliki sifat fisikokimia yang serupa, karena resolusi yang tidak memadai dapat menyebabkan tumpang tindih puncak dan menurunkan akurasi kuantifikasi (23,26).

Hasil uji linieritas menunjukkan hubungan proporsional antara respons detektor dan konsentrasi analit, dengan koefisien korelasi lebih dari 0,995 untuk seluruh komponen. Respons linier yang tinggi ini menegaskan bahwa metode memiliki sensitivitas deteksi yang konsisten dan sesuai untuk analisis kuantitatif dalam rentang konsentrasi yang diuji (27). Uji presisi dengan nilai RSD di bawah 1% menunjukkan repeatabilitas pengukuran yang sangat baik serta menggambarkan kontrol yang baik terhadap variasi instrumental dan operasional dalam kondisi laboratorium. Selain itu, hasil uji akurasi yang menunjukkan nilai *recovery* mendekati 100% mengindikasikan bahwa metode mampu memberikan hasil kuantifikasi yang tidak bias tanpa pengaruh signifikan dari matriks atau kesalahan sistematis selama preparasi dan analisis sampel (23). Kombinasi parameter validasi berupa linieritas, presisi, dan akurasi yang baik menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan memenuhi kriteria validasi utama yang dipersyaratkan untuk analisis kuantitatif pada bidang farmasi (23).

Analisis kuantitatif terhadap sampel formulasi menunjukkan bahwa kadar L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine sesuai dengan klaim label dan berada dalam rentang spesifikasi yang dapat diterima (90–110%), yang menunjukkan kualitas formulasi dan keseragaman kandungan pada skala laboratorium. Waktu analisis yang relatif singkat, yaitu kurang dari 7 menit, menegaskan efisiensi metode UPLC dibandingkan teknik kromatografi konvensional yang umumnya memerlukan waktu analisis lebih lama serta konsumsi pelarut yang lebih besar (15). Efisiensi ini memberikan keuntungan praktis dalam proses evaluasi formulasi awal dan mendukung penerapan metode untuk analisis rutin maupun skrining cepat pada tahap pengembangan produk (28,29).

Secara keseluruhan, metode UPLC yang dikembangkan telah memenuhi persyaratan validasi internasional sesuai pedoman USP <1225>, ICH Q2(R2), dan AOAC, sehingga layak digunakan sebagai metode analisis pada penelitian farmasi. Namun demikian, meskipun metode menunjukkan kinerja yang sangat baik pada skala laboratorium, diperlukan penelitian lanjutan seperti uji *robustness*, validasi antar laboratorium, serta verifikasi

pada skala produksi yang lebih besar untuk memastikan konsistensi dan keandalannya dalam lingkungan industri. Oleh karena itu, metode yang diusulkan dapat menjadi alat analisis yang efektif untuk evaluasi formulasi pada tahap awal pengembangan, sekaligus memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut menuju penerapan pada pengendalian mutu skala industri.

5. KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) yang dikembangkan valid dan andal untuk penetapan kadar L-Histidine HCl·H₂O, L-Arginine HCl, Glycine, dan L-Threonine dalam formulasi sediaan injeksi steril skala laboratorium. Metode yang dihasilkan memenuhi parameter validasi analitik, meliputi spesifisitas, linieritas, presisi, dan akurasi, serta mampu memisahkan analit secara selektif tanpa interferensi matriks. Waktu analisis yang singkat (<7 menit) menunjukkan efisiensi metode untuk analisis multikomponen secara simultan. Hasil penelitian ini menegaskan bahwa metode UPLC yang dikembangkan berpotensi digunakan sebagai alat evaluasi formulasi dan pengendalian mutu awal sediaan injeksi berbasis asam amino, serta dapat menjadi dasar pengembangan lebih lanjut menuju penerapan pada skala produksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak laboratorium Universitas Jember dan PT.OI atas fasilitas dan dukungan teknis selama penelitian, serta kepada pembimbing dan rekan-rekan yang telah memberikan bimbingan dan masukan yang berharga.

DAFTAR PUSTAKA

1. Konuklu D, Eylem CC, Göçerler F, Süslü İ. A Rapid and Validated Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Method with Pre-Column Derivatization and Fluorescence Detection for Quantification of Twenty Amino Acids in Total Parenteral Nutrition Solutions. *J Chromatogr Sci*. 2026;64(2):14–9.
2. Unger N, Ferraro A, Holzgrabe U. Investigation of tryptophan-related yellowing in parenteral amino acid solution: Development of a stability-indicating method and assessment of degradation products in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 2020 Jan 5;177.
3. Jain S, Shah RP. Drug-Excipient Compatibility Study Through a Novel Vial-in-Vial Experimental Setup: A Benchmark Study. Vol. 24, *AAPS PharmSciTech*. 2023.
4. Qomara. W. F, Musfiroh, I. &, R. W. Evaluasi Stabilitas dan Inkompatibilitas Sediaan Oral Liquid Windi. *Maj Farmasetika*. 2023;8(3):209–23.
5. Singh A, Mishra JN. Preformulation Studies and Their Parallel Role in Analytical and Formulation Development Objectives of Preformulation Studies. 2025;3(11):9–11.
6. Iacone R, Scanzano C, Santarpia L, Cioffi I, Contaldo F, Pasanisi F. Macronutrients in parenteral nutrition: Amino acids. *Nutrients*. 2020;12(3):1–14.
7. Khan AA, Khan A, Khan MA, Kumar D, Naquvi KJ. Total parenteral nutrition: A boon to non-functional gastrointestinal patients. Vol. 2, *Intelligent Pharmacy*. KeAi Publishing Communications Ltd.; 2024. p. 263–9.
8. Berlana D. Parenteral Nutrition Overview. Vol. 14, *Nutrients*. MDPI; 2022.
9. Farhan M, McCallion N, Bennett J, Cram A, O'Brien F. Stability and compatibility of parenteral nutrition solutions; a review of influencing factors. *Eur J Pharm Biopharm*. 2023 Jun 1;187:87–95.
10. Jo J, Choi NR, Lee E, Lee JY, Ahn YG. Comparison of Two Derivative Methods for the Quantification of Amino Acids in PM2.5 Using GC-MS/MS. *Chemosensors*. 2025;13(8):1–16.
11. Jaudzems G, Guthrie J, Lahrichi S, Fuerer C. Total amino acids by UHPLC-UV in infant formulas and adult nutritionals, first action 2018.06. *J AOAC Int*. 2019;102(5):1574–88.
12. Lestari LA, Rohman A, Riswahyuli, Purwaningsih S, Kurniawati F, Irnawati. Analysis of amino acids in food using High Performance Liquid Chromatography with derivatization techniques: a review. *Food Res*. 2022;6(3):435–42.
13. More SS, Kadam SP, K.Redasani DV. A Review on Analytical Method Development And Validation. *Int J Pharm Res Appl*. 2025;10(1):1177–95.
14. Chawla PA. “Prospects of UPLC in Pharmaceutical Analysis over HPLC.” *Biomed J Sci Tech Res*. 2022;45(1):36075–7.
15. Gupta MK, Ghuge A, Parab M, Al-Refaei Y, Khandare A, Dand N, et al. A comparative review on High-

- Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) & High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) with current updates. *Curr Issues Pharm Med Sci.* 2022 Dec 1;35(4):224–8.
16. Ibrahim MA, Sherif AY, Alshora D, Alsaadi B. A Robust and Reliable UPLC Method for the Simultaneous Quantification of Rosuvastatin Calcium, Glibenclamide, and Candesartan Cilexetil. *Separations.* 2024;11(4).
 17. Rajendra K, Sahil P, Santosh B. A Systematic Review on UPLC. *Int J Pharm Sci.* 2024;2(6):1267–75.
 18. Dahl-Lassen R, van Hecke J, Jørgensen H, Bukh C, Andersen B, Schjoerring JK. High-throughput analysis of amino acids in plant materials by single quadrupole mass spectrometry. Vol. 14, *Plant Methods.* 2018.
 19. Gray N, Zia R, King A, Patel VC, Wendon J, McPhail MJW, et al. High-Speed Quantitative UPLC-MS Analysis of Multiple Amines in Human Plasma and Serum via Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate: Application to Acetaminophen-Induced Liver Failure. *Anal Chem.* 2017;89(4):2478–87.
 20. Turkiewicz IP, Wojdyło A, Tkacz K, Nowicka P. UPLC/ESI-Q-TOF-MS analysis of (poly)phenols, tocols and amino acids in *Chaenomeles* leaves versus in vitro anti-enzyme activities. *Ind Crops Prod.* 2022 Jul 1;181.
 21. Chavan A V., Gandhimathi R. Quality by Design Approach: Progress in Pharmaceutical method Development and Validation. *Biomed Pharmacol J.* 2023;16(3):1669–79.
 22. Addae-Mensah I, Beltramini H, Haggag AA, Hoogmartens J, Shaohong J, Molzon JA, et al. WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. *World Heal Organ - Tech Rep Ser.* 2006;(937).
 23. ICH. International commission on harmonisation. ICH Q2 (R2) validation of analytical procedures. *Eur agency Eval Med Prod* [Internet]. 2023;2(December 2023). Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
 24. Cullen D, Stafford N, Davey L, Breen N, Calciano S, Zhang N. Application Note Amino Acid Analysis using Andrew+ Automated Preparation.
 25. Depkes RI. *Farmakope Indonesia edisi VI.* Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2020.
 26. Sankar R, Chowdary LG, Kumar AG, Babu SP. Analytical Method Validation Parameters An Updated Review (Lavanya Chowdary). *Int J Pharm Sci Rev Res* [Internet]. 2020;61(2):1–7. Available from: www.globalresearchonline.net
 27. Kahsay BN, Moeller L, Imming P, Neubert RHH, Gebre-Mariam T. Development and Validation of a Simple, Selective, and Accurate Reversed-Phase Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection (RP-HPLC/DAD) for the Simultaneous Analysis of 18 Free Amino Acids in Topical Formulations. *Chromatographia.* 2022;85(7):665–76. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10337-022-04160-0>
 28. Lovena TN, Hari DG, Arief EJ. Determination of Total Flavonoid Levels Of Cinnamon Leaf Infusion (*Cinnamomum burmanni* (Nees & T. Nees) Blume.) Using UV-Vis Spectrofotometry. *JURNAL FARMASIMED (JFM).* 2025 Nov 13;8(1):184-90.
 29. Situmorang NB, Marbun RA. Formulation and Evaluation of Maggot Extract Nanocream (*Hermatia illucens*) as a Future Anti-Aging Candidate. *Jurnal Farmasimed (JFM).* 2025 Apr 30;7(2):143-50.