

LAPORAN PENELITIAN

Judul

**Pengaruh Cara Sterilisasi Terhadap Penguraian Kloramfenikol
Dalam Sediaan Tetes Mata Dengan Metode Uji Dipercepat**

Oleh :

Insan Sunan Kurniawan Syah, S.Si, Apt.



**Fakultas Farmasi
Universitas Padjadjaran
2006**

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh cara sterilisasi, yaitu dengan pemanasan (sterilisasi B) dan bakteri filter (sterilisasi C) terhadap laju penguraian kloramfenikol dalam tetes mata dengan uji dipercepat. Sebagai penentuan kadar kloramfenikol digunakan Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan kolom LichroCART RP Select-B sebagai fase diam, fase gerak air:metanol (40:60), laju aliran 0,7 mL/menit, deteksi ultraviolet dengan panjang gelombang pada 279 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cara sterilisasi B dan cara sterilisasi C masing-masing memberikan batas umur simpan selama 0.8 dan 1.2 bulan dan waktu paruh selama 5.25 dan 7.83 bulan. Hasil pengujian statistik menggunakan desain eksperimen dua faktorial menunjukkan adanya efek yang signifikan antara perbedaan cara sterilisasi dengan waktu penyimpanan pada masing-masing suhu.

ABSTRACT

The effect of sterilization methods on the decomposition rate of chloramphenicol in eye-drops preparation had been studied . High performance liquid chromatography (HPLC) with a column of LichroCART RP Select-B, a mobile phase of water-methanol (40:60), a flow rate 0.7 mL/min, and an ultraviolet detection of 279 nm was used to determine chloramphenicol concentration. The study showed that sterilization methods using autoclave and bacteria filter resulted in a shelf-life of 0.8 and 1.2 month and a half-life of 5.25 and 7.83 month respectively. The statistic analysis result using experiment design two factorial show a significant effect between the method of sterilization with stored time difference to each temperature.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, karena atas perkenan-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian ini.

Laporan penelitian dengan judul “Pengaruh Cara Sterilisasi Terhadap Penguraian Kloramfenikol Dalam Sediaan Tetes Mata Dengan Metode Uji Dipercepat” ini merupakan bagian dari kegiatan Tri Dharma Perguruan Tinggi yaitu di bidang penelitian.

Ucapan terima kasih yang setulusnya penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Anas Subarnas, M.Sc., Apt. selaku Dekan Farmasi Universitas Padjadjaran; Drs. Sohadi Warya, MS., Apt.; Mutakin, M.Si., Apt. dan Heri Darmawan, S.Si. yang membantu dalam penelitian ini. Juga tidak lupa kepada pihak-pihak lain yang dengan tulus dan ikhlas telah membantu penelitian ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari, masih banyak kekurangan yang harus diperbaiki dalam laporan penelitian ini, baik dari segi penulisan maupun materinya. Namun demikian, sumbangan kritik dan saran penulis terima untuk menyempurnakan penelitian selanjutnya. Semoga laporan penelitian ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang memerlukan.

Jatinangor, Desember 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	3
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	9
METODE PENELITIAN	10
HASIL PEMBAHASAN	12
KESIMPULAN DAN SARAN	24
DAFTAR PUSTAKA	25

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil Pengukuran Konsentrasi Larutan Baku Kloramfenikol dalam Dapar Borat	12
Tabel 2. Konsentrasi Kloramfenikol (ppm) dalam Sediaan Tetes Mata dengan Menggunakan Dapar Borat Yang Disterilisasi Menggunakan Pemanasan dengan Bakterisida (Sterilisasi B)	13
Tabel 3. Konsentrasi Kloramfenikol (ppm) dalam Sediaan Tetes Mata dengan Menggunakan Dapar Borat Yang Disterilisasi Tanpa Pemanasan dengan Bakteri Filter (Sterilisasi C)	13
Tabel 4. Penurunan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 50°C	13
Tabel 5. Penurunan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 60°C	14
Tabel 6. Penurunan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 70°C	15
Tabel 7. Prosentase Data Statistik Pengurangan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 50°C	21
Tabel 8. Prosentase Data Statistik Pengurangan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 60°C	22
Tabel 9. Prosentase Data Statistik Pengurangan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 70°C	23

DAFTAR GAMBAR/ILUSTRASI

	Halaman
Gambar 1. Struktur Kloramfenikol	4
Gambar 2. Penguraian obat dalam larutan air yang dipercepat pada temperatur yang dinaikkan	6
Gambar 3. Plot Arrhenius untuk memperkirakan kestabilan obat pada temperatur ruangan	6
Gambar 4. Waktu dalam hari yang diperlukan untuk turunnya potensi obat sampai 90% dari nilai mula-mula	7
Gambar 5. Pada log t_{90} (yaitu waktu potensi 90%) pada sumbu tegak terhadap kebalikan temperatur (skala kelvin dan celcius diperlihatkan pada sumbu mendatar)	8
Gambar 6. Kurva baku kloramfenikol	12
Gambar 7. Grafik penurunan kadar kloramfenikol suhu penyimpanan 50°C	14
Gambar 8. Grafik penurunan kadar kloramfenikol suhu penyimpanan 60°C	14
Gambar 9. Grafik penurunan kadar kloramfenikol suhu penyimpanan 70°C	15
Gambar 10. Plot Arrhenius tetes mata kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)	17
Gambar 11. Plot Arrhenius tetes mata kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C)	18
Gambar 12. Kromatogram kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)	19
Gambar 13. Kromatogram kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C)	20

PENDAHULUAN

Semua larutan untuk mata harus dibuat steril jika diberikan dan bila mungkin ditambahkan bahan pengawet yang cocok untuk menjamin sterilitas selama pemakaian (Ansel, 1989). Produk untuk diteteskan ke dalam mata, walaupun menurut definisi bukan sediaan parentral, mempunyai karakteristik yang banyak kesamaannya dan bahkan identik dengan sediaan parentral. Formulasi preparat obat mata dengan zat aktif yang stabil secara terapeutis membutuhkan kemurnian bahan yang tinggi juga bebas dari kontaminan kimia, fisika (partikel), dan mikroba (Lachmann, 1994). Larutan ini biasanya dikemas dalam wadah untuk dosis tunggal dan dosis ganda yang sering beredar di pasaran.

Meskipun larutan untuk mata disterilkan dengan uap air mengalir dalam otoklaf pada wadah akhirnya, metode yang digunakan tergantung pada sifat khusus dari sediaanannya. Obat-obat tertentu yang dalam media asam termostabil (tahan panas) dapat menjadi termolabil (tidak tahan panas) ketika di dapar mendekati kisaran pH fisiologis ($\pm 7,4$). Jika perlu saringan bakteri dapat digunakan untuk menghindari pemakaian panas. Meskipun saringan bakteri bekerja dengan sangat efisien, sterilisasi ini tidak menjamin seperti dalam otoklaf. (Ansel, 1989).

Kloramfenikol adalah salah satu antibiotik yang secara kimiawi diketahui paling stabil dalam segala pemakaian dan memiliki stabilitas yang sangat baik pada suhu kamar dan kisaran pH 2 – 7, stabilitas maksimumnya dicapai pada pH 6. Pada saat yang sama, kloramfenikol juga peka terhadap katalisis asam-umum/basa-umum yang diakibatkan oleh bahan-bahan yang ada dalam dapar. Dalam kebanyakan sistem yang penting untuk farmasi, dapat digunakan untuk mempertahankan pada pH tertentu, sebagai tambahan efek pH terhadap laju reaksi, sering menjadi kemungkinan reaksi dikatalisis oleh satu atau beberapa komponen penyusun dapar. Reaksi yang demikian disebut katalis asam umum atau basa umum tergantung pada apakah komponen katalisis tersebut asam atau basa (Martin, 1993). Untuk sterilisasi larutan kloramfenikol, metode yang terpilih adalah pemanasan bersama bakterisida pada suhu 100°C selama 30 menit, diikuti dengan pendinginan cepat. Dengan metode ini berlangsungnya hidrolisis hanya terjadi sebesar 3 – 4% saja, sedangkan apabila menggunakan cara otoklaf (suhu 115°C dengan waktu yang sama) dihasilkan degradasi sebesar kira-kira 10 – 15%. Reaksi-reaksi fotolisis

mudah dicegah dengan cara menghindari cahaya, hal ini dapat dilakukan dengan pengemasan hasil obat di dalam wadah yang tidak tembus cahaya, di sini seluruh cahaya akan terhalang atau digunakan filter yang akan menghilangkan seluruh cahaya yang panjang gelombangnya dapat mengkatalisis reaksi. Botol gelas warna amber diketahui mampu bertindak sebagai pelindung cahaya yang paling baik, karena diketahui bahwa kloramfenikol juga peka terhadap cahaya (Connors, 1992).

Pada umumnya untuk tetes mata dicantumkan pembatasan daya tahannya yang secara internasional terletak antara 4-6 minggu setelah pemakaian. Pembatasan waktu ini diperlukan, oleh karena bahan pengawet sering mengalami kehilangan aktivitasnya pada tingkat kontaminasi mikroorganisme yang tinggi (Voigt, 1994)

Dengan metode sterilisasi yang menggunakan proses pemanasan dari sediaan tetes mata terjadi proses degradasi atau penurunan kadar yang lebih cepat dari kloramfenikol dibandingkan terhadap metode sterilisasi yang tidak menggunakan pemanasan (bakteri filter).

Penelitian yang dipercepat pada temperatur tinggi juga banyak dilakukan oleh banyak perusahaan, metode uji dipercepat untuk produk-produk farmasi yang didasarkan pada prinsip-prinsip kinetika kimia yang ditunjukkan oleh Garret dan Carper. Data yang diperoleh berupa deviasi sehingga hanya merupakan perkiraan bukan hasil yang eksak. Juga dengan metode ini kita dapat memperkirakan batas umur simpan (kadaluwarsa) dari suatu sediaan yang akan kita uji dengan kondisi uji yang memadai dan memungkinkan.

TINJAUAN PUSTAKA

Obat mata (*ophthalmica*) terdiri dari tetes mata, salep mata (*oculenta*), pencuci mata (*collyria*) dan beberapa bentuk pemakaian khusus. Pemakaian yang khusus dapat berupa penyemprot mata sebagai bentuk depo, yang digunakan pada mata utuh atau terluka (Voigt, 1994).

Sediaan tetes mata adalah cairan atau suspensi steril yang mengandung satu atau lebih zat aktif, tanpa atau dengan penambahan zat tambahan yang sesuai. Sediaan ini digunakan pada mata dengan cara meneteskan obat tersebut pada selaput lendir di sekitar kelopak dan bola mata (BP, 2001).

Sediaan tetes mata merupakan larutan steril, yang dalam pembuatannya memerlukan pertimbangan yang tepat terhadap pemilihan formulasi sediaan, seperti penggunaan bahan aktif, pengawet, isotonisitas, dapar, viskositas, dan pengemasan yang cocok (Ansel, 1989).

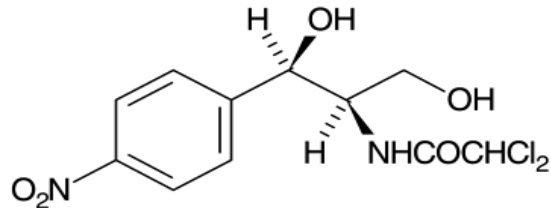
Sediaan tetes mata biasanya mengandung satu atau lebih bahan aktif, dan merupakan elemen terpenting yang memberikan efek terapeutik dari sediaan tetes mata itu. Kloramfenikol merupakan zat aktif berupa serbuk hablur halus berbentuk jarum, putih sampai putih kelabu atau putih kekuningan, tidak berbau, rasa sangat pahit. Stabilitas yang paling baik berada pada kisaran pH 2 – 7 dan stabilitas maksimumnya di capai pada pH 6.

Antibiotik ini bersifat unik diantara senyawa alam karena adanya gugus nitrobenzen dan merupakan turunan asam dikloroasetat. Bentuk yang aktif secara biologis yaitu bentuk levonya. Zat ini larut sedikit dalam air (1:400) dan relatif stabil. Kloramfenikol diinaktivasi oleh enzim yang ada dalam bakteri filtrat tertentu. Disini terjadi reduksi gugus nitro dan hidrolisis ikatan amida, juga terjadi asetilasi.

Kloramfenikol merupakan suatu antibiotik spektrum luas yang berasal dari beberapa jenis *Streptomyces* misalnya *S. venezuelae*, *S. phaeochromogenes* var. *chloromyceticus*, dan *S. omiyamensis*. Setelah para ahli berhasil mengelusidasi strukturnya, maka sejak tahun 1950, kloramfenikol sudah dapat disintesis secara total. *S. venezuelae* pertama kali diisolasi oleh **Burkholder** pada tahun 1947 dari contoh tanah yang diambil dari Venezuela. Filtrat kultur cair organisme menunjukkan aktivitas

terhadap beberapa bakteri Gram negatif dan riketsia. Bentuk kristal antibiotik ini diisolasi oleh Bartz pada tahun 1948 dan dinamakan kloromisetin karena adanya ion klorida dan didapat dari aktinomisetes.

Kloramfenikol mempunyai rumus kimia yang cukup sederhana yaitu 1-(p-nitrofenil)-2-dikloroasetamido-1,3-propandirol.



Gambar 1 Struktur kloramfenikol

Antibiotik ini bersifat unik diantara senyawa alam karena adanya gugus nitrobenzen dan antibiotik ini merupakan turunan asam dikloroasetat. Bentuk yang aktif secara biologis yaitu bentuk levonya. Zat ini larut sedikit dalam air (1:400) dan relatif stabil. Kloramfenikol diinaktivasi oleh enzim yang ada dalam bakteri tertentu. Disini terjadi reduksi gugus nitro dan hidrolisis ikatan amida; juga terjadi asetilasi.

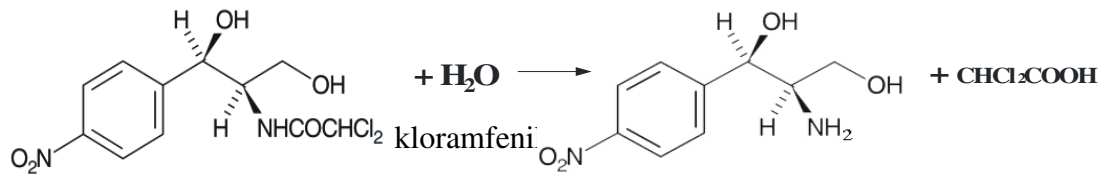
Berbagai turunan kloramfenikol berhasil disintesis akan tetapi tidak ada senyawa yang khasiatnya melampaui khasiat kloramfenikol.

Kloramfenikol adalah salah satu antibiotik yang secara kimiawi diketahui paling stabil dalam segala pemakaian. Kloramfenikol memiliki stabilitas yang sangat baik pada suhu kamar dan kisaran pH 2 sampai 7, stabilitas maksimumnya dicapai pada pH 6. Pada suhu 25°C dan pH 6, memiliki waktu paruh hampir 3 tahun. Yang menjadi penyebab utama terjadinya degradasi kloramfenikol dalam media air adalah pemecahan hidrolitik pada lingkaran amida. Laju reaksinya berlangsung di bawah orde pertama dan tidak tergantung pada kekuatan ionik media (Connors, 1992).

Berlangsungnya hidrolisis kloramfenikol terkatalisis asam umum/basa umum, tetapi pada kisaran pH 2 sampai 7, laju reaksinya tidak tergantung pH. Spesies pengkatalisis adalah asam umum atau basa umum yang terdapat pada larutan dapar yang digunakan; khususnya pada ion monohidrogen fosfat, asam asetat tidak terdisosiasi, serta ion asam monohidrogen dan dihidrogen sitrat dapat mengkatalisis proses degradasi. Di bawah pH 2, hidrolisis terkatalisis ion hidrogen spesifik memegang peranan besar pada

terjadinya degradasi kloramfenikol. Obat ini sangat tidak stabil dalam suasana basa, dan reaksinya terlihat terkatalisis baik asam maupun basa spesifik (Connors, 1992).

Jalur utama degradasi kloramfenikol adalah hidrolisis ikatan amida, membentuk amida yang sesuai dan asam dikloroasetat.



Degradasi kloramfenikol lewat dehalogenasi tidak menjadi bagian yang berperan dalam gambaran degradasi total, setidaknya di bawah pH 7. (Connors, 1992).

Laju degradasi tergantung secara linier pada konsentrasi dapar, spesies dapar beraksi sebagai asam umum dan basa umum. Laju hidrolisis kloramfenikol tidak tergantung kekuatan ionik, dan tidak terpengaruh oleh konsentrasi ion dihidrogen fosfat, dengan demikian aktivitas katalisisnya dianggap berasal dari aksi ion monohidrogen fosfat sebagai katalisis basa umum. (Connors, 1992).

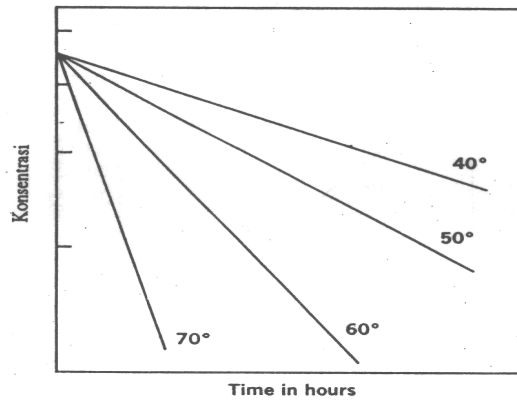
Kromatografi merupakan teknik pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu sampel yang dibawa oleh fase gerak melewati fase diam. KCKT adalah kromatografi cair kolom modern, dimana teori dasarnya merupakan pengembangan dari kromatografi cair kolom klasik. Kemajuan dalam teknologi kolom, pompa tekanan tinggi dan detektor yang peka telah menyebabkan perubahan kromatografi kolom menjadi suatu sistem pemisahan yang cepat dan efisien (Johnson, 1991).

Pada KCKT, diperkenalkan penggunaan fase diam yang berdiameter kecil dalam kolom yang efisien. Teknologi kolom partikel kecil ini memerlukan sistem pompa bertekanan tinggi yang mampu mengalirkan fase gerak dengan tekanan tinggi agar tercapai laju aliran 1-2 mL/menit. Karena sampel yang digunakan sangat kecil (<20µg), oleh karena itu diperlukan detektor yang sangat peka. Dengan teknologi ini, pemisahan berlangsung sangat cepat dengan daya pisah sangat tinggi.

Penelitian yang dipercepat pada temperatur tinggi juga banyak dilakukan oleh banyak perusahaan, tetapi kriterianya sering merupakan kriteria buatan yang tidak didasarkan prinsip-prinsip dasar kinetik. Contohnya, beberapa perusahaan menggunakan aturan

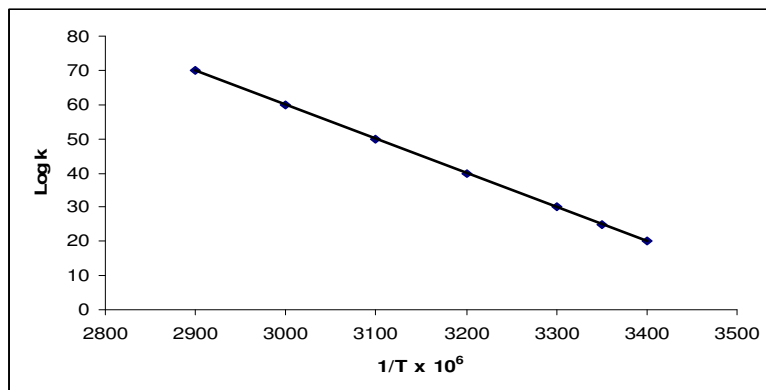
bahwa penyimpanan cairan pada 37°C mempercepat penguraian dua kali lajunya pada temperatur normal, sementara perusahaan lain mengandaikan bahwa kondisi tersebut mempercepat penguraian dengan dua puluh kali laju normal. Perkiraan waktu penyimpanan harus diikuti dengan analisis yang dirancang secara hati-hati untuk bermacam-macam bahan dalam tiap produk jika hasilnya ingin cukup berarti.

Metode uji dipercepat untuk produk-produk farmasi yang didasarkan pada prinsip-prinsip kinetika kimia ditunjukkan oleh Garret dan Carper. Menurut teknik ini nilai k untuk penguraian obat dalam larutan pada berbagai temperatur yang dinaikkan diperoleh dengan memplot beberapa fungsi konsentrasi terhadap waktu, seperti terlihat pada gambar berikut:



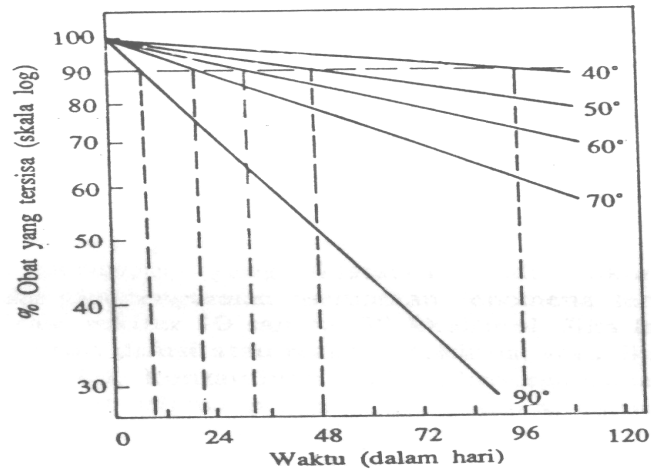
Gambar 2 Penguraian obat dalam larutan air yang dipercepat pada temperatur yang dinaikkan

Logaritma laju penguraian spesifik kemudian diplot terhadap kebalikan dari temperatur mutlak seperti yang terlihat pada gambar berikut:

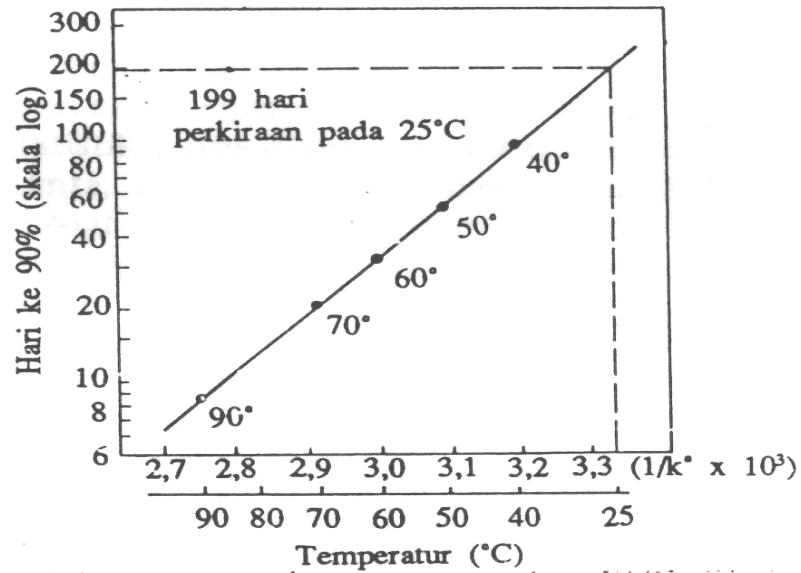


Gambar 3 Plot Arrhenius untuk memperkirakan kestabilan obat pada temperatur ruangan

Free dan Blythe dan akhir-akhir ini, Amirjahed dan rekan-rekan telah mengusulkan metode yang mirip di mana periode waktu fraksional diplotkan terhadap kebalikan temperatur, dan waktu dalam hari yang diperlukan oleh obat untuk terurai menjadi beberapa fraksi dari potensi asalnya pada temperatur kamar diperoleh. Pendekatannya diilustrasikan pada gambar 2.7 dan 2.8 Seperti diamati pada gambar 2.7, persen (%) log dari obat yang tertinggal diplotkan terhadap waktu dalam hari, dan waktu yang diperlukan untuk menurunnya potensi sampai 90% dari harga awal yaitu t_{90} , di baca pada grafik. Dalam gambar 2.8, log waktu sampai 90% kemudian diplotkan terhadap $1/T$, dan waktu pada 25°C memberikan umur produk dalam hari. Umur dan tanggal kadaluwarsa ditentukan dengan cara ini.



Gambar 4 Waktu dalam hari yang diperlukan untuk turunnya potensi obat sampai 90% dari nilai mula-mula.



Gambar 5 Pada log t_{90} (yaitu waktu potensi 90%) pada sumbu tegak terhadap kebalikan temperatur (skala kelvin dan celcius diperlihatkan pada sumbu mendatar)

Dengan metode ini, *overage* yaitu kelebihan jumlah obat yang harus ditambahkan pada sediaan untuk menjaga paling sedikit 100% dari jumlah yang tercantum, semua umur yang diperkirakan untuk obat, dapat dihitung dengan mudah dan ditambahkan pada sediaan tersebut pada saat pembuatan.

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Penelitian bertujuan untuk mengetahui penurunan kadar sediaan tetes mata kloramfenikol dengan metode sterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B) dibandingkan terhadap metode sterilisasi tanpa pemanasan/bakteri filter (sterilisasi C) dengan metode uji dipercepat.

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang metode sterilisasi mana yang paling baik ditinjau dari penurunan kadar kloramfenikol dari sediaan tetes mata dan menentukan batas waktu kadaluwarsa dari sediaan.

METODE PENELITIAN

Alat-alat yang digunakan adalah HPLC Shimadzu model LC-10A yang dilengkapi oleh detektor UV-Vis SPD-10AV, Kolom LichroCART C-18 RP Select-B, Oven memmet, Pengaduk Ultrasonik NEY, Evaporator Rotary RE1-D, pH-Meter, Syringe, Alat-alat kimia.

Bahan-bahan yang digunakan adalah kloramfenikol base 0,5%, Aqua bidestilata (P.T Ikapfarmindo Putramas), natrium tetraborat (boraks), acidum boricum (asam borat), metanol pro hplc.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode uji dipercepat dengan langkah kerja sebagai berikut :

1. Pembuatan Larutan Tetes Mata Kloramfenikol

- Sebanyak 50 mg kloramfenikol, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
- Sebanyak 150 mg asam borat ditimbang, dan ditambahkan natrium tetraborat (boraks) yang di timbang sebanyak 30 mg, ke dua zat tersebut di campurkan ke dalam labu ukur yang berisi kloramfenikol.
- Kloramfenikol dilarutkan dengan aqua bides, dikocok, dimasukkan ke dalam labu ukur yang selanjutnya dimasukkan ke dalam pengaduk ultrasonik untuk membantu kelarutan dari kloramfenikol dalam sediaan.
- Setelah larut, ditambahkan dengan aqua bides sampai tanda batas dalam labu ukur, dibersihkan leher labu ukur dengan tissue bersih, lalu dihomogenkan.

2. Pembuatan Fase Gerak

Diambil 300 ml metanol dan 250 ml aquabides dengan perbandingan komposisi fase gerak 60:40. Dimasukkan ke dalam gelas ukur 500 ml. Kemudian dikocok sampai homogen. Disaring fase gerak dengan filter eluen dan udara dalam fase gerak dihilangkan dengan pengaduk ultrasonik.

3. Pembuatan Larutan Baku

Ditimbang seksama 50 mg baku kloramfenikol, dimasukkan ke dalam labu ukur. Kemudian ditambahkan aqua bidestilata sampai tanda batas pada tiap-tap labu. Buat larutan baku kloramfenikol dengan konsentrasi 1, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm dari larutan pada labu ukur dengan cara diencerkan.

4. Pembuatan Kurva Baku

Larutan tetes mata kloramfenikol dengan konsentrasi 1,5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm disuntikkan ke dalam kolom dengan kondisi terpilih yaitu pada laju alir sebesar 0,7 ml/menit, kemudian dicatat luas puncaknya dan dihitung persamaan koefisien korelasi r pada persamaan regresi linier $Y = a + bx$.

5. Prosedur Metode Uji Dipercepat

Disiapkan sediaan obat tetes mata kloramfenikol dengan konsentrasi ± 20 ppm masing-masing dengan volume 10 ml ke dalam wadah yang inert yaitu dalam wadah vial coklat. Jumlah wadah (vial coklat) disesuaikan dengan pengambilan sampel dan replikasinya sebanyak dua kali (duplo) setiap pengambilannya.

Lalu sediaan obat tetes mata dimasukkan ke dalam oven pada kondisi uji pada temperatur 50, 60, 70⁰C.

Ditentukan konsentrasi awal (C_0) pada masing-masing suhu. Setelah dilakukan penyimpanan selama beberapa hari di dalam oven, di ambil masing-masing sampel pada tiap suhu sebanyak dua sampel (duplo) untuk pengukuran. Terlebih dahulu dimasukkan ke dalam lemari es untuk menghentikan penguraian dari zat aktif selama beberapa menit.

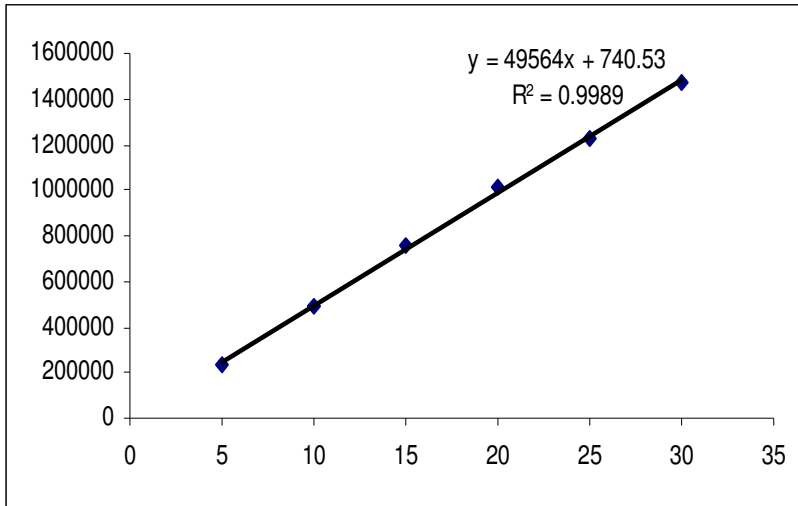
Kemudian dilakukan pengukuran kadar (konsentrasi) dari sediaan obat tetes mata dengan instrumen KCKT. Pengamatan dilakukan pada interval hari yang konstan.

Konsentrasi yang diperoleh kemudian diplot terhadap waktu sehingga diperoleh nilai k (konstanta laju reaksi) untuk penguraian obat dalam larutan pada tiap suhu yang dinaikkan. Logaritma laju penguraian spesifik kemudian diplot terhadap kebalikan dari temperatur mutlak, dan hasilnya berupa garis lurus dan diekstrapolasikan sampai temperatur ruang k_{25} .

HASIL PEMBAHASAN

1. Pembuatan Baku Kloramfenikol

Hasil dari pembuatan kurva baku dari kloramfenikol menghasilkan data dan kurva sebagai berikut:



Gambar 6 Kurva baku kloramfenikol

Tabel 1 Hasil Pengukuran Konsentrasi Larutan Baku Kloramfenikol dalam Dapar Borat

ppm	PA
5	233976
10	494239
15	758263
20	1015736
25	1231654
30	1474761

Dari pembuatan kurva baku di atas maka kita dapat memperoleh hasil perhitungan kadar dari sediaan tetes mata kloramfenikol yang telah di uji pada masing-masing temperatur dipercepat atau temperatur yang lebih tinggi daripada suhu kamar (25°C) sebagai suhu penyimpanannya.

2. Hasil Penetapan Kadar

Hasil penetapan kadar kloramfenikol yang tersisa dalam sediaan tetes mata kloramfenikol yang telah disimpan pada beberapa suhu selama waktu tertentu ditunjukkan dalam tabel sebagai berikut:

Tabel 2 Konsentrasi Kloramfenikol (ppm) dalam Sediaan Tetes Mata dengan Menggunakan Dapar Borat Yang Disterilisasi Menggunakan Pemanasan dengan Bakterisida (Sterilisasi B)

t (°C)	Waktu sampling (hari)													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	16	18	20
50	19.6822	-	-	-	-	15.238	-	-	12.376	10.623	9.8756	6.6954	5.8045	5.284
60	21.0831	18.842	16.313	13.881	11.254	9.3202	7.8258	5.9372	-	-	-	-	-	-
70	20.1587	13.263	8.3843	5.3697	3.1119	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan (-): tidak dilakukan waktu pengambilan

Tabel 3 Konsentrasi Kloramfenikol (ppm) dalam Sediaan Tetes Mata dengan Menggunakan Dapar Borat Yang Disterilisasi Tanpa Pemanasan dengan Bakteri Filter (Sterilisasi C)

t (°C)	Waktu sampling (hari)													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	16	18	20
50	19.6822	-	-	-	-	15.1	-	-	12.81	11.144	9.847	7.831	7.051	6.284
60	21.0831	20.67	17.32	13.901	11.73	9.823	7.819	6.272	-	-	-	-	-	-
70	20.1587	14.41	9.015	5.638	3.315	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan (-): tidak dilakukan waktu pengambilan

3. Hasil Perbandingan antara Sterilisasi B dan Sterilisasi C pada Kloramfenikol menggunakan Dapar Borat

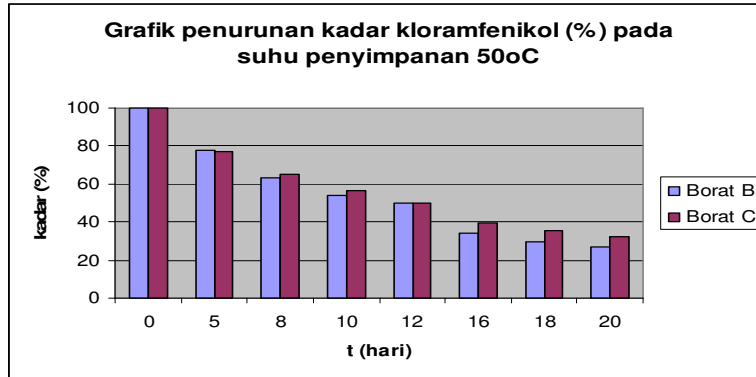
Tabel 4 Penurunan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 50°C

Suhu 50°C:

Sterilisasi	Waktu Pengambilan (hari)							
	0	5	8	10	12	16	18	20
Borat B	100	77.42	62.88	53.97	50.18	34.02	29.49	26.84
Borat C	100	76.72	65.08	56.62	50.03	39.79	35.83	31.93

Keterangan: Borat B = kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)

Borat C = kloramfenikol yang disterilisasi dengan bakteri filter (sterilisasi C)



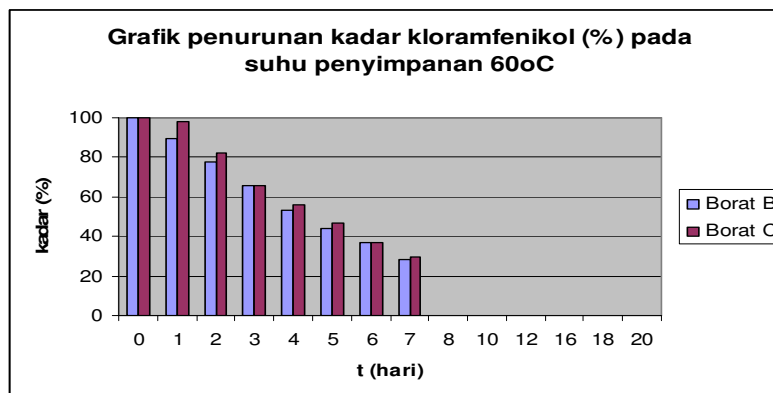
Gambar 7 Grafik penurunan kadar kloramfenikol suhu penyimpanan 50°C
 Keterangan: Borat B = kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)
 Borat C = kloramfenikol yang disterilisasi dengan bakteri filter (sterilisasi C)

Tabel 5 Penurunan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 60°C

Suhu 60°C:

Sterilisasi	Waktu Pengambilan (hari)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Borat B	100	89.37	77.37	65.84	53.38	44.21	37.12	28.16
Borat C	100	98.06	82.13	65.93	55.64	46.59	37.09	29.75

Keterangan: Borat B = kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)
 Borat C = kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C)



Gambar 8 Grafik penurunan kadar kloramfenikol suhu penyimpanan 60°C

Keterangan: Borat B = kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)

Borat C = kloramfenikol yang disterilisasi dengan bakteri filter (sterilisasi C)

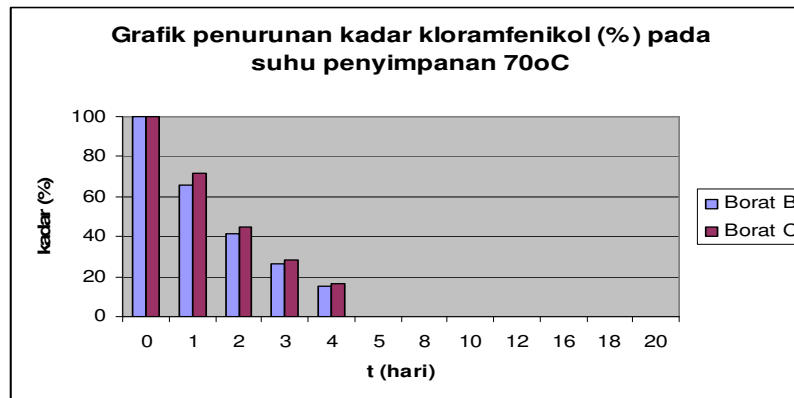
Tabel 6 Penurunan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 70°C

Suhu 70°C:

Sampel	Waktu Pengambilan (hari)				
	0	1	2	3	4
Borat B	100	65.79	41.59	26.64	15.44
Borat C	100	71.48	44.72	27.97	16.44

Keterangan: Borat B = kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)

Borat C = kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C)



Gambar 9 Grafik penurunan kadar kloramfenikol suhu penyimpanan 70°C

Keterangan: Borat B = kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)

Borat C = kloramfenikol yang disterilisasi dengan bakteri filter (sterilisasi C)

Dari Tabel 4, 5, dan 6 terlihat bahwa perbandingan penurunan konsentrasi pada masing-masing suhu uji dalam sediaan tetes mata kloramfenikol terlihat jelas. Bahwa pada sediaan tetes mata kloramfenikol yang disterilisasi dengan menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B) mengalami penurunan konsentrasi yang lebih cepat dibandingkan dengan sediaan yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C) pada masing-masing waktu (hari) uji. Ini menunjukkan bahwa sediaan

yang disterilisasi dengan sterilisasi menggunakan bakteri filter tanpa pemanasan (sterilisasi C) lebih stabil dibandingkan dengan sediaan yang disterilisasi dengan menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B).

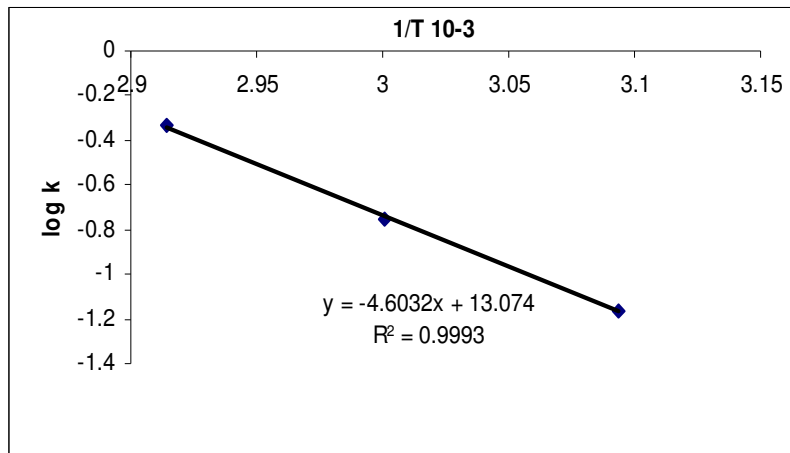
Ini dapat disebabkan karena pada sterilisasi menggunakan bakteri filter tanpa pemanasan (sterilisasi C), terdapat proses penyaringan yang berfungsi untuk menyaring partikel-partikel dari larutan. Partikel-partikel ini dapat bersifat sebagai partikel pengganggu pada saat proses pengukuran konsentrasi oleh instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pori-pori atau lubang melalui medium penyaring terdiri dari suatu rentangan ukuran. Membran filter yang digunakan pada penelitian kali ini memiliki porositas 0,2 mikron, porositas yang seringkali dipakai untuk mensterilisasi produk-produk steril. Dengan ukuran porositas yang sekecil ini memungkinkan partikel-partikel kecil atau partikel pengganggu tertahan pada membran filter sehingga hasil saringan tersebut dimungkinkan terbebas dari partikel-partikel pengganggu sehingga sediaan tersebut akan lebih stabil. Apabila menggunakan membran filter yang mempunyai pori yang lebih besar dan ukurannya mempunyai garis tengah sebesar 0,5 mikron, maka kemungkinan partikel-partikel pengganggu tersebut tidak akan tertahan pada membrannya dan akan ikut masuk ke dalam rongga pori yang besar dan menyatu dengan larutan hasil saringannya. Dan apabila hal tersebut terjadi maka kemungkinan sediaan yang akan kita periksa konsentrasinya akan berkurang kestabilannya pada saat kita ukur dibandingkan dengan menggunakan membran filter dengan pori yang lebih kecil.

Berbeda dengan sterilisasi menggunakan pemanasan bersama bakterisida (sterilisasi B) akan kurang stabil dibandingkan dengan penggunaan bakteri filter (sterilisasi C). Ini disebabkan karena pada proses ini melibatkan proses pemanasan sebelumnya, karena dengan meningkatnya suhu sterilisasi didalamnya dapat dimungkinkan kestabilan dari produk tersebut akan sedikit berkurang karena berhubungan dengan laju reaksi suatu produk dimana dengan meningkatnya suhu maka laju reaksinya pun akan meningkat dan mengakibatkan penguraian atau degradasi suatu zat aktif dalam sediaan akan menjadi lebih cepat. Keadaan seperti ini berpengaruh terhadap lamanya waktu batas umur simpan menjadi lebih pendek dari sediaan tetes mata kloramfenikol ini. Berbeda dengan proses sterilisasi yang tidak melibatkan proses pemanasan, kestabilan produk bahan obat tidak begitu terpengaruh oleh proses

sterilisasinya sehingga batas umur simpan dari sediaan tersebut akan lebih panjang dibandingkan dengan sediaan yang di sterilisasi yang melibatkan pemanasan pada saat proses sterilisasinya.

4. Hasil Perhitungan Batas Umur Simpan dari Sediaan Tetes Mata Kloramfenikol

Gambar di bawah ini adalah Plot Arrhenius yang merupakan plot antara $\log k$ dari masing-masing suhu terhadap $1/T \cdot 10^{-3}$ pada setiap perlakuan sterilisasi yang berbeda:



Gambar 10 Plot Arrhenius tetes mata kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)

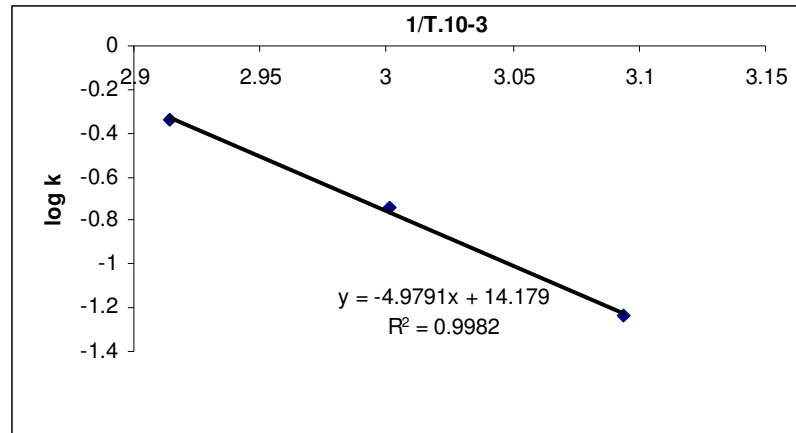
$$\text{Slope} = -4.6023$$

$$E_a = 21064.52 \text{ kal/mol} = 21.065 \text{ kkal/mol}$$

$$K_{25} = 4.402 \cdot 10^{-3}$$

$$T_{1/2} = 157.43 \text{ hari} = 5.25 \text{ bulan}$$

$$T_{90} = 23.85 \text{ hari}$$



Gambar 11 Plot Arrhenius tetes mata kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C)

$$\text{Slope} = -4.9791$$

$$E_a = 22784.67 \text{ kal/mol} = 22.785 \text{ kkal/mol}$$

$$K_{25} = 2.952 \cdot 10^{-3}$$

$$T_{1/2} = 234.76 \text{ hari} = 7.83 \text{ bulan}$$

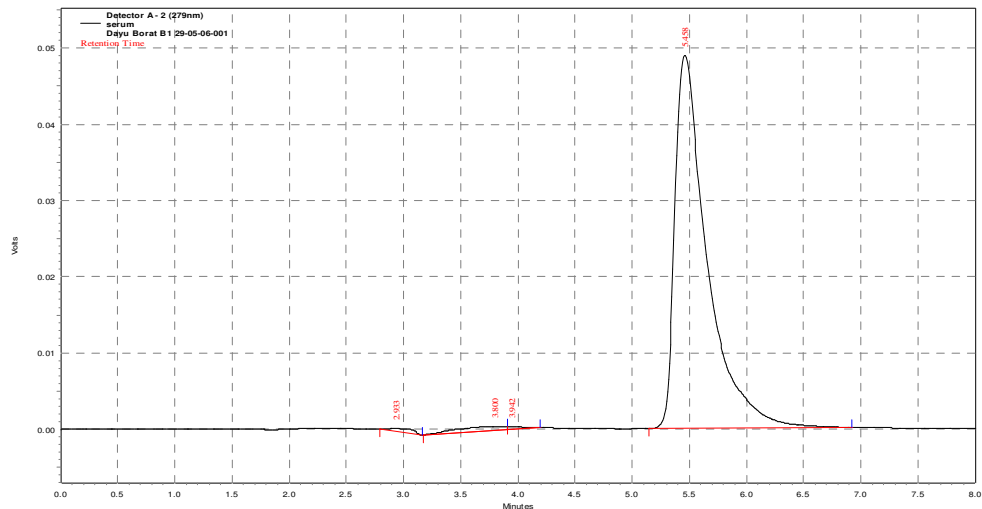
$$T_{90} = 35.57 \text{ hari} = 1.2 \text{ bulan}$$

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, kita dapat mengetahui dari batas umur simpan dari sediaan tetes mata kloramfenikol. Dari hasil perhitungan di dapat bahwa batas umur simpan dari sediaan tetes mata kloramfenikol dengan sterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B) jauh lebih pendek dibandingkan dengan sterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C). Parameter yang digunakan pada penelitian kali ini apabila suatu bahan obat atau zat aktif yang terdapat dalam sediaan mengalami degradasi sebanyak 70% sehingga kadar obat yang tersisa dalam sediaan tinggal 30% yang dapat kita asumsikan bahwa obat tersebut sudah tidak memberikan efek terapeutik bagi penggunaannya sehingga dapat kita jadikan dasar untuk menentukan batas umur simpan dari sediaan tetes mata. Nilai perhitungan menunjukkan bahwa t_{90} atau batas umur simpan dari sediaan kloramfenikol yang di sterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B) dengan waktu 23.85 hari atau 0.8 bulan lebih pendek dibandingkan dengan sediaan kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C) dengan waktu 1,2 bulan. Juga nilai

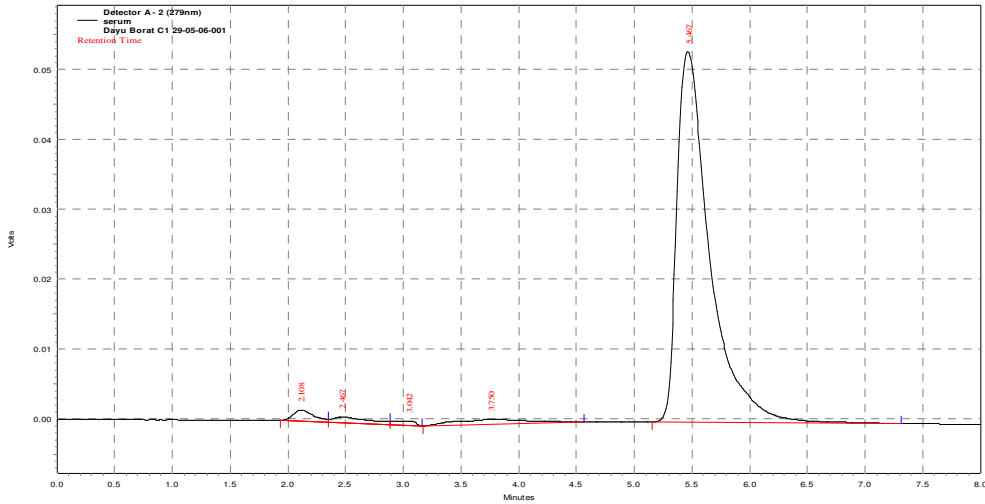
dari $t_{1/2}$ atau dapat kita sebut sebagai waktu paruh dari sediaan kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B) menunjukkan waktu selama 5,25 bulan jauh lebih pendek dibandingkan dengan sediaan kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C) yang memiliki waktu $t_{1/2}$ selama 7,83 bulan.

Ini dapat disebabkan oleh nilai energi aktivasi (E_a) dari kloramfenikol yang disterilisasi dengan pemanasan (sterilisasi B) lebih kecil dibandingkan dengan kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C). Sehingga apabila nilai energi aktivasi dari suatu zat aktif kecil, maka ini dapat berpengaruh terhadap laju reaksi dari zat aktif tersebut di mana laju reaksinya akan lebih cepat dibandingkan dengan zat aktif yang mempunyai harga energi aktivasi yang lebih besar di mana laju reaksinya akan lebih lambat. Laju reaksi akan berpengaruh terhadap kestabilan dari zat aktif tersebut dalam sediaan di mana zat aktif yang mempunyai laju reaksi yang cepat, kestabilannya akan berkurang dibandingkan dengan zat aktif yang mempunyai laju reaksi yang lebih lambat.

Ini menunjukkan bahwa sediaan kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C) mempunyai kestabilan yang lebih baik dibandingkan dengan sediaan kloramfenikol disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B) di tinjau dari nilai t_{90} dan juga dari $t_{1/2}$.



Gambar 12 Kromatogram kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B)



Gambar 13 Kromatogram kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C)

Dari Gambar 4.7 dan 4.8 terlihat bahwa kloramfenikol memiliki waktu retensi pada menit ke-5. Kondisi yang digunakan pada penelitian kali ini adalah : Spesifikasi Kolom LichroCART C-18 RP Select-B, 5 μ m, panjang 250 mm, diameter dalam (ID) 4 mm. KCKT (Shimadzu) : Detektor ultraviolet-cahaya tampak SPD 10AV. Pompa LC 10A. Fase gerak metanol dan air (60:40), dan dengan panjang gelombang 279 nm. Laju alir 0,7 ml/menit., volume injeksi 20 μ l.

5. Hasil Analisis Data dengan Eksperimen Faktorial Dua Faktor axb

Tabel 7 Prosentase Data Statistik Pengurangan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 50°C

Suhu 50°C:

Waktu (hari)	Cara sterilisasi		Σ
	Sterilisasi dengan pemanasan	Sterilisasi tanpa pemanasan	
0	100	100	200
5	77.42	76.72	154.14
8	62.88	65.08	127.96
10	53.97	56.62	110.59
12	50.18	50.03	100.21
16	34.02	39.79	73.81
18	29.49	35.83	65.32
20	26.84	31.93	58.77
Σ	434.8	456	

Dari tabel ANAVA terlihat bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel, berarti semua H_0 ditolak. Dengan nilai kekeliruan sebesar 10%, dapat disimpulkan bahwa terdapat efek yang signifikan terhadap konsentrasi kloramfenikol dalam sediaan tetes mata antara penggunaan cara sterilisasi yang berbeda dengan waktu penyimpanan pada suhu 50°C.

Karena F hitung lebih besar daripada F tabel maka perlu dilakukan uji lanjut Newman-Keuls untuk mengetahui waktu sampling mana yang memberikan efek yang berbeda.

Dari uji rentang Newman-Keuls pada suhu penyimpanan 50°C (Lampiran 6) dapat dilihat bahwa dengan dengan tingkat kekeliruan 5%, maka yang memberikan efek yang signifikan terhadap penurunan kadar kloramfenikol dalam sediaan tetes mata menggunakan jenis sterilisasi B dan sterilisasi C pada waktu sampling dari hari ke-0 sampai hari ke-16. Sedangkan pada hari ke-18 sampai hari ke-20 memberikan efek yang tidak signifikan

Tabel 8 Prosentase Data Statistik Pengurangan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 60°C

Suhu 60°C:

Waktu (hari)	Sterilisasi		Σ
	Sterilisasi dengan pemanasan	Sterilisasi tanpa pemanasan	
0	100	100	200
1	89.37	98.06	187.43
2	77.37	82.13	159.5
3	65.84	65.93	131.77
4	53.38	55.64	109.02
5	44.21	46.59	90.8
6	37.12	37.09	74.21
7	28.16	29.75	57.91
Σ	495.45	515.9	

Dari tabel ANAVA terlihat bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel, berarti semua H_0 ditolak. Dengan nilai kekeliruan sebesar 10%, dapat disimpulkan bahwa terdapat efek yang signifikan terhadap konsentrasi kloramfenikol dalam sediaan tetes mata antara penggunaan cara sterilisasi yang berbeda dengan waktu penyimpanan pada suhu 60°C

Karena F hitung lebih besar daripada F tabel maka perlu dilakukan uji lanjut Newman-Keuls untuk mengetahui waktu sampling mana yang memberikan efek yang berbeda.

Dari uji rentang Newman-Keuls pada suhu penyimpanan 60°C (Lampiran 6) dapat dilihat bahwa dengan dengan tingkat kekeliruan 5%, maka yang memberikan efek yang signifikan terhadap penurunan kadar kloramfenikol dalam sediaan tetes mata menggunakan jenis sterilisasi B dan sterilisasi C pada waktu sampling dari hari ke-0 sampai hari ke-7.

Tabel 9 Prosentase Data Statistik Pengurangan Kadar Kloramfenikol (%) dalam Sediaan dengan Suhu Penyimpanan 70°C

Suhu 70°C:

Waktu (hari)	Sterilisasi		Σ
	Sterilisasi dengan pemanasan	Sterilisasi tanpa pemanasan	
0	100	100	200
1	65.79	71.48	137.27
2	41.59	44.72	86.31
3	26.64	27.97	54.61
4	15.44	16.44	31.88
Σ	249.46	260.61	

Dari tabel ANAVA terlihat bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel, berarti semua H_0 ditolak. Dengan nilai kekeliruan sebesar 10%, dapat disimpulkan bahwa terdapat efek yang signifikan terhadap konsentrasi kloramfenikol dalam sediaan tetes mata antara penggunaan cara sterilisasi yang berbeda dengan waktu penyimpanan pada suhu 70°C.

Karena F hitung lebih besar daripada F tabel maka perlu dilakukan uji lanjut Newman-Keuls untuk mengetahui waktu sampling mana yang memberikan efek yang berbeda.

Dari uji rentang Newman-Keuls pada suhu penyimpanan 70°C (Lampiran 6) dapat dilihat bahwa dengan dengan tingkat kekeliruan 5%, maka yang memberikan efek yang signifikan terhadap penurunan kadar kloramfenikol dalam sediaan tetes mata menggunakan jenis sterilisasi B dan sterilisasi C pada waktu sampling dari hari ke-0 sampai hari ke-4.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian diketahui bahwa serapan maksimum (λ_{maks}) dari zat kloramfenikol berada pada panjang gelombang 279 nm dengan menggunakan instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor ultraviolet-cahaya tampak.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa sediaan tetes mata kloramfenikol yang disterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida (sterilisasi B) memiliki batas umur simpan (t_{90}) dan waktu paruh ($t_{1/2}$) yang lebih pendek dibandingkan sediaan tetes mata kloramfenikol yang disterilisasi tanpa pemanasan dengan bakteri filter (sterilisasi C).

Dari uji statistik menggunakan desain eksperimen dua faktorial axb dapat disimpulkan bahwa terdapat efek yang signifikan terhadap konsentrasi kloramfenikol dalam sediaan tetes mata antara penggunaan cara sterilisasi yang berbeda dengan waktu penyimpanan pada suhu 50, 60, dan 70°C. Dari uji lanjut Newman Keuls disimpulkan, dengan tingkat kekeliruan sebesar 5%, maka yang memberikan efek yang signifikan terhadap penurunan kadar kloramfenikol dalam sediaan tetes mata menggunakan jenis sterilisasi menggunakan pemanasan dengan bakterisida dan sterilisasi dengan bakteri filter terjadi pada semua waktu pengambilan pada suhu penyimpanan 60° dan 70°C. Sedangkan pada suhu penyimpanan 50°C, pada hari ke-18 sampai hari ke-20 memberikan efek yang tidak signifikan

2. Saran

Untuk berikutnya, penulis menyarankan hal-hal sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh wadah gelas yang digunakan selama penyimpanan terhadap stabilitas dari zat aktif kloramfenikol.
2. Perlu dilakukan penelitian menggunakan pembawa selain air atau kombinasi dari beberapa pelarut yang sesuai.
3. Perlu dilakukan penelitian menggunakan alat *climatic chamber* yang lebih akurat dalam metode uji dipercepat.

DAFTAR PUSTAKA

1. _____, 1975, *Remington's Pharmaceutical Science*, Fifteenth edition, Mack Publishing Company: Pennsylvania.
2. _____, 1994, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, second edition, edited by Ainley Wade and Paul J. Weller, The Pharmaceutical Press: London.
3. Stuart J, Rupp H and Hurlbut J. 2001. *Analysis of Chloramphenicol in Crawfish Meat*:http://www.wipo.int/cgi_pct_guest_getbykey5_KEY=01_65401.010907_ELEMENT_SET=DECL.pdf
4. Ansel H, 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Edisi keempat*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
5. C.P, Evelyn, 1989, *Anatomi dan Fisiologis untuk Paramedis*, Alih bahasa: Sri Yuliani Handoyo. Gramedia. Jakarta
6. Connors K, 1992. *Stabilitas Kimiawi Sediaan Farmasi. Jilid I dan II*. IKIP Semarang Press. Semarang
7. Depkes R.I. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan
8. Gritter. R. J., Bobbit, J. M., and A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi kedua. ITB. Bandung. hal 186-230.
9. Johnson, E. L. dan R. Stevenson. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Terjemahan Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung 1-54, 230-255, 300-301
10. Lachman L., Liberman H.A., Kanig J. 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri*. Edisi ke-3. Universitas Indonesia Press. Jakarta
11. Martin A, 1993. *Farmasi Fisik*. Jilid II. Edisi ke-3. Universitas Indonesia Press. Jakarta
12. Martindale, 1982, *The Extra Pharmacopeia*, 28th edition, edited by James E. F. Reynolds, The Pharmaceutical Press: London.
13. Mulja, M., dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press. hal 236-259, 279-285
14. Sudjana, 1995, *Desain dan Analisis Eksperimen*. Edisi IV, Tarsito. Bandung
15. Voigt, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta