

VALIDASI METODE ANALISIS KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI UNTUK PENETAPAN KADAR AMOXICILIN DALAM PLASMA SECARA IN VITRO

Ni Nyoman Puspita Sari¹⁾, Fatimawali¹⁾, Max Revolta John Runtuwene²⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

²⁾Jurusan Kimia FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Amoxicillin was an antibiotic concentration in the blood which measly quantity so it requires the sensitive, selective, and valid methods for analysis. In this study, optimization of the analysis condition and validation of analysis methods was carried out using the HPLC system for analysis of amoxicillin in plasma levels. Chromatography system consisting of symmetry C18 column (15 cm x 4.6 mm, 5 m) with a mobile phase methanol: potassium dihydrogen phosphate buffer (10:90 v / v), pH 5. The solution was detected at a wavelength of 230 nm, the analysis was performed at a flow rate of 2.0 ml/min and the injection volume of 20 uL. In the amoxicillin solution validation showed good linearity values ($r = 0.9409$) as well as the value of LOD 2.5 mg/mL and the LOQ of 8.36 mg/mL. This method also meets the criteria of accuracy (% diff does not exceed $\pm 15\%$ except at a concentration of 3 mg / mL) and precision (intra-day and inter-day for 2 days with % RSD $\leq 15\%$). While the results of the analysis of amoxicillin levels in the blood by using the validation is very small because of the low bioavailability of amoxicillin.

Keywords: Amoxicillin, HPLC, Validation, Methanol, Bioavailability

ABSTRAK

Amoxicillin merupakan antibiotik yang konsentrasinya dalam darah sangat kecil sehingga diperlukan metode analisis yang sensitif, selektif, dan valid untuk analisis. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi kondisi analisis dan validasi metode analisis menggunakan sistem KCKT untuk analisis kadar Amoxicilin dalam plasma. Sistem kromatografi terdiri dari kolom symmetry C₁₈ (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m) dengan fase gerak methanol: buffer kalium dihidrogen fosfat (10:90 v/v), pH 5. Larutan dideteksi pada panjang gelombang 230 nm, analisis dilakukan pada laju alir 2,0 ml/menit dan volume penyuntikan 20 μ L. Pada validasi larutan amoxicillin memperlihatkan nilai linearitas yang baik ($r = 0,9409$) serta nilai LOD 2,5 μ g/mL dan LOQ 8,36 μ g/mL. Metode ini juga memenuhi kriteria akurasi (% diff tidak melampaui $\pm 15\%$ kecuali pada konsentrasi 3 μ g/mL) dan presisi (intra hari dan inter hari selama 2 hari dengan % RSD $\leq 15\%$). Sedangkan hasil analisis kadar amoxicillin di dalam darah dengan menggunakan validasi tersebut sangat kecil karena bioavailabilitas amoxicillin yang rendah.

Kata kunci: Amoxicilin, KCKT, Validasi, Metanol, Bioavailabilitas

PENDAHULUAN

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya. Adapun parameter-parameter tersebut antara lain adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas, linearitas dan rentang, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ), ketangguhan metode, kekuatan metode (Lestari, 2008).

Berdasarkan *Food and Drug Administration* (FDA), salah satu obat yang wajib diuji bioekuivalensinya adalah amoxicilin. Amoxicilin merupakan obat golongan β -laktam termasuk dalam kelompok antibiotik yang paling sering digunakan pada pengobatan anti-infeksi termasuk pada pengobatan bronkitis. Pengobatan Bronkitis menggunakan amoxicilin harus dengan dosis yang tinggi (Sudjadi, 2012).

Telah dilakukan beberapa penelitian tentang validasi metode analisis untuk obat amoxicilin diantaranya yaitu yang dilakukan oleh Dhoka tahun 2010, penelitian ini bertujuan untuk penentuan kadar obat amoxicilin dan bromheksin hidroklorida dalam bentuk sediaan oral dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) serta dilakukan juga validasi untuk metode analisisnya, hasil validasinya menunjukkan presisi dan akurasi yang baik sehingga metode HPLC ini dapat digunakan secara rutin untuk analisis kualitatif sediaan oral obat tersebut serta baik digunakan untuk penetapan kadar obat amoxicilin dan bromheksin

Penelitian oleh Suresh *et al.*, 2011, penelitian ini bertujuan untuk melakukan pengembangan dan validasi dalam bahan baku obat dan sediaan farmasi amoxicilin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. Validasinya menunjukkan hasil yang sederhana, cepat akurat dan tepat sehingga metode ini dapat diterapkan untuk analisis pengendalian kualitas rutin Amoksisilin dalam jumlah besar.

Metode analisis yang telah dipublikasi seringkali dimodifikasi untuk menyesuaikan kondisi dengan peralatan dan bahan yang tersedia di laboratorium pengujian. Modifikasi ini perlu di validasi untuk memastikan pelaksanaan pengujian yang sesuai dari metode analisis (*Food and drug administration*, 2001). Pada penelitian ini, akan dilakukan modifikasi terhadap metode analisis yang telah dipublikasi dan validasi dari modifikasi tersebut. Modifikasi metode tersebut selanjutnya akan digunakan untuk penetapan kadar obat amoxicilin dalam plasma darah secara *in vitro*.

Tujuan Penelitian ini yaitu melakukan validasi metode analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) terhadap penetapan kadar amoxicilin serta melakukan penetapan kadar Amoxicilin dalam plasma darah secara *in vitro* menggunakan metode analisis yang telah di validasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Alat

KCKT dengan detektor UV 230 nm (Shimadzu), kolom symmetry C₁₈ (15 cm x 4,6 mm; ukuran partikel 5 μ m), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1800), sentrifugator, timbangan analitik, pH meter, mikropipet 100 dan 1000 μ L, blue tip, tabung reaksi, tabung sentrifuge, rak tabung dan lemari pendingin.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah zat aktif amoxicilin, metanol HPLC, Metanol (P.A), buffer kalium dihidrogen fosfat (pH diatur 5,0 dengan asam fosfat), NaOH, larutan EDTA, aquabidestilata, plasma darah .

Cara Kerja

Pembuatan Larutan Induk Amoxicilin

Ditimbang sebanyak 25 mg zat aktif amoxicilin. Dilarutkan ke dalam metanol hingga volume akhir 100 mL. Konsentrasi 250 µg/mL digunakan sebagai larutan induk.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum untuk Analisis

Dibuat spektrum serapan ultraviolet larutan amoxicilin dengan konsentrasi 250, 100, 50, 10, 3, dan 1 µg/mL dalam metanol pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer Ultraviolet-Visibel, ditentukan panjang gelombang maksimumnya yang sesuai.

Optimasi waktu (*Operaiting time*) untuk Analisis

Dilihat waktu kestabilan (*Operaiting time*) Amoxicilin selama 0 – 10 menit dengan menggunakan spektrofotometri Ultraviolet-visibel pada panjang gelombang maksimum dan konsentasi terpilih. Kestabilannya dilihat dari perubahan absorbansi.

Pembuatan Dapar Fosfat pH 5

Dilarutkan KH_2PO_4 sebanyak 7,8 gram dalam 900 mL air, disesuaikan pH 5 dengan penambahan NaOH. Diencerkan dengan air hingga 1000 mL.

Penetapan Fase Gerak

Larutan standar amoxicilin pada konsentrasi 20 µg/mL diinjeksikan sebanyak 20 µL pada komposisi fase gerak metanol : buffer kalium dihidrogen fosfat pada perbandingan 10:90 dan 40:60 (v/v) (pH 5) dengan perbandingan fase gerak terpilih ditentukan laju alir 1,2 – 2,0 mL/menit dan deteksi pada panjang gelombang terpilih. Catat waktu retensi, luas

puncak, dihitung jumlah plat teoritis, faktor kapasitas dan asimetris.

Validasi Metode Analisis Amoxicilin Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas

Larutan Sampel dengan konsentrasi 3, 6, 9, 12 dan 15 µg/mL Sebanyak 20 µL larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Setelah itu dibuat kurva kalibrasi dengan persamaan garis linear ($y=a+bx$). Dihitung koefisien korelasi (r) dari kurva tersebut.

Uji Akurasi

Larutan amoxicilin dengan konsentrasi (3, 6 dan 9 µg/mL). Analisis dengan prosedur yang sama seperti pada sampel yaitu disuntikkan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diulangi sebanyak tiga kali untuk setiap konsentrasi kemudian hitung persentase akurasi (% diff) dan perolehan kembali (% recovery). Nilai rata-rata % diff disyaratkan $\pm 15\%$.

Uji Presisi

Dari hasil akurasi tersebut dilakukan pengukuran intraday dan interday (selama 2 hari berturut-turut, kemudian hitung persentase simpangan baku relatif % RSD dari masing-masing konsentrasi dengan nilai lebih kecil sama dengan 15%.

Batas Deteksi dan Batas Kuantitas

Batas deteksi (*Limit of Detection/LOD*) dan batas kuantitas (*Limit Of Quantitation/LOQ*) dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$SY = \frac{\sqrt{\sum(Y-Y1)^2}}{n-2}$$
$$LOD = \frac{3,3 \times SY}{S}$$
$$LOQ = \frac{10 \times SY}{S}$$

Uji Kesesuaian Sistem

Larutan amoxicilin pada konsentrasi 3 µL/ml diinjeksikan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih, diulangi sebanyak enam kali. Kemudian dihitung jumlah plat teoritis, faktor kapasitas, asimetris.

Penetapan Kadar Amoxicilin dalam plasma Darah

Pengambilan sampel darah

Darah diperoleh dari pengambilan darah peneliti sebanyak 12 mL. Darah tersebut diambil menggunakan dispo 12 mL. Darah kemudian dimasukkan de dalam tabung yang sudah berisi larutan EDTA.

Ekstraksi dan Penetapan Kadar Amoxicilin Dalam Plasma

Sebelum penetapan kadar amoxicilin dalam plasma, dilakukan *spaijing* sampel yaitu dengan cara pengukur larutan induk amoxicilin 500 µg/mL ke dalam sistem KCKT. Sebanyak 0,5 mL darah yang diambil dari sampel pada tabung EDTA di masukkan ke dalam tabung sentrifuge + Pelarut Organik (Metanol) sebanyak 0,7 mL divorteks 30 detik, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Kemudian Alikuot disaring , diambil supernatan (plasma) lalu supernatan diinjeksi sebanyak 20 µL ke alat KCKT. Dianalisis kromatogram untuk mengetahui kondisi kromatogram blanko darah.

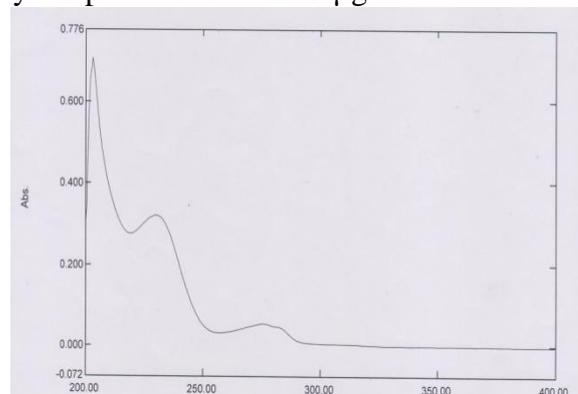
Dilakukan hal yang sama terhadap darah yang sudah mengandung larutan amoxicilin masing-masing dengan konsentrasi 250 dan 500 µg/mL. Diekstraksi dan diinjeksi sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan kondisi KCKT yang telah ditentukan sebelumnya, kemudian dicatat waktu retensi dan luas puncaknya. Hitung kadar Amoxicilin dalam darah dengan cara mensubtitusikan luas puncak yang telah terpilih ke dalam persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri ultraviolet-visibel. Dari beberapa konsentrasi yaitu 250, 100, 50, 10, 3 dan

1 µg/mL diperoleh serapan maksimum Amoxicilin pada panjang gelombang 230 nm dan konsentrasi paling optimum yaitu pada konsentrasi 3 µg/mL.



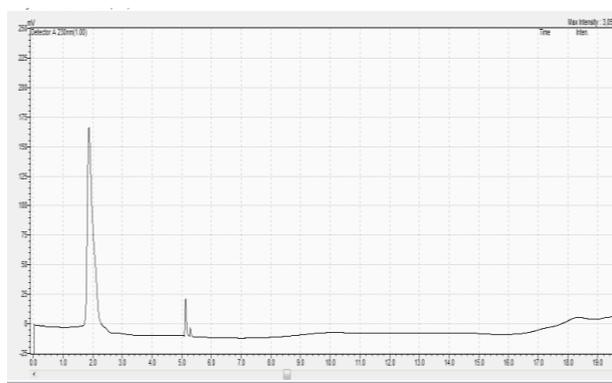
Gambar 6.1. Spektrum panjang gelombang maksimum Amoxicilin pada konsentrasi 3 µg/mL.

Optimasi Waktu Kestabilan (Operating Time)

Pada optimasi waktu kestabilan (*Operating time*) dengan menggunakan panjang gelombang terpilih yaitu 230 dan konsentrasi 3 µg/mL dengan waktu 0-10 menit menunjukkan absorbansi yang stabil yaitu 0,11.

Penetapan komposisi fase gerak dan laju alir dilakukan pada kondisi optimum yang terpilih, kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom Symmetry (C18) pada dua kondisi, pertama kecepatan alir 2,0 mL/menit, panjang gelombang 230 nm dan volume penyuntikan 20 µL. Komposisi fase gerak semula terdiri dari metanol : buffer kalium dihidrogen fosfat dengan PH 5 (10:90). Pada komposisi ini, waktu retensi amoxicilin yaitu 1,87 menit. Dimana hasil dari kondisi pertama menunjukkan plat teoritis (N) 7790,62 , HETP 0,0019, faktor kapasitasnya 2,75 dan asimetri atau faktor pengekorannya 0,50. Kemudian dilakukan modifikasi fase gerak yaitu komposisi kedua metanol : Buffer kalium dihidrogen fosfat PH 5 (40:60) waktu retensi amoxicilin yaitu 2,85 menit dengan menggunakan laju alir 2,0 mL/menit.

Pada kondisi kedua dihasilkan kondisi kromatogram yang melebar dan dihasilkan *double peak*, hasil plat teoritisnya (N) 182,65, HETP 0,0820, faktor kapasitasnya 4,74 dan asimetrinya 0,71. Jika dibandingkan dari kedua kondisi tersebut kondisi pertama memberikan hasil parameter yang memenuhi persyaratan karena semakin banyak lempeng teoritis (N) maka pemisahan semakin baik. Sedangkan jika HETP semakin rendah maka efisiensi kolom semakin baik. Sehingga dipilihlah kondisi pertama sebagai parameter terhadap penetapan amoxicilin selanjutnya.



Gambar 6.2. Kromatogram Amoxicilin dengan konsentrasi 3 µg/mL

Kondisi Analisis :

Fase gerak : Metanol : buffer kalium dihidrogen fosfat (10 : 90)
 Kolom : Acclaim (C18 ; 15 cm X 4,6 mm)
 Volume injeksi : 20 µL
 Kecepatan Alir : 2,0 mL/menit
 Detektor : Diode Array Detector
 Panjang gelombang : 230 nm

Validasi Metode Analisis Amoxicilin

Uji Linearitas

Uji ini dilakukan pada seri larutan standar Amoxicilin dengan empat konsentrasi yaitu 3, 6, 9, dan 12 µg/mL. Dari uji ini diperoleh persamaan regresi linier dan koefisien korelasi (r). Hasil uji ini diperoleh persamaan $y = 853835X - 990947$ dan koefisien korelasi (r) 0,9409

Uji Akurasi

Pada uji akurasi ini digunakan 3 konsentrasi yaitu 3 µg/mL, 6 µg/mL dan 9 µg/mL. Persyaratan yang ditentukan adalah %diff ±15% (Gandjar & Rohman, 2007). Pada konsentrasi 3 µg/mL diperoleh hasil %diff rata-rata sebesar 21,55%, konsentrasi 6 µg/mL diperoleh %diff rata-rata sebesar 1,55 dan konsentrasi 9 diperoleh %diff rata-rata sebesar -0,91%. Kemudian dihitung juga nilai perolehan kembalinya (% Recovery) dengan cara membandingkan konsentrasi amoxicilin yang terukur dengan kadar amoxicilin sebenarnya dikalikan 100%. Nilai uji perolehan kembali pada konsentrasi 3 µg/mL berkisar 121,33%, konsentrasi 6 µg/mL berkisar 101,55% dan konsentrasi 9 µg/mL berkisar 99,10%. Perolehan kembali disyaratkan pada kisaran 99-101% pada tiap level (Gandjar & Rohman, 2007).

Berdasarkan ketiga konsentrasi yang telah diperoleh, perolehan kembali yang belum sesuai yaitu pada konsentrasi 3 µg/mL sedangkan untuk konsentrasi 6 µg/mL dan 9 µg/mL telah sesuai dengan persyaratan yang ada. Perbedaan hasil perolehan kembali dan %diff ini disebabkan oleh luas area puncak yang timbul saat pembacaan di sistem KCKT. Keakuratan data tersebut disebabkan oleh sistem yang ada karena sistem tersebut berubah-ubah sehingga keakuratan data tersebut berkurang. Pengujian perolehan kembali dilakukan pada tiga konsentrasi dengan tujuan untuk memberikan batas range bahwa pada konsentrasi demikian analit yang

terukur pada daerah tersebut masih terbaca dengan baik oleh detektor

Uji Presisi

Uji presisi dilakukan intra-hari dan inter-hari, pada pengujian intra-hari, konsentrasi yang digunakan yaitu 3 µg/mL diperoleh %RSD (*Relative Standard Deviation*) sebesar 0,32%, pada konsentrasi 6 µg/mL sebesar 0,85% dan konsentrasi 9 µg/mL diperoleh 0,06%. Sedangkan pada pengujian inter-hari %RSD (*Relative Standard Deviation*) yang diperoleh dari konsentrasi 3 µg/mL yaitu 2,63%, konsentrasi 6 µg/mL yaitu 1,15% dan 9 µg/mL yaitu 1,56%. Terlihat dari kedua data intra-hari dan inter-hari selama 2 hari berturut-turut hasil %RSD (*Relative Standard Deviation*) ≤ 15 %. Hasil ini sesuai dengan teori yang mengatakan bahwa untuk senyawa-senyawa dengan pengukuran kadar sekelumit, nilai %RSD dapat diterima jika ≤ 15 % (Gandjar & Rohman, 2007). sehingga bisa dikatakan pada uji presisi ini memenuhi syarat. Uji ini dilakukan intra-hari dan inter hari selama 2 hari untuk memastikan bahwa setelah sediaan disimpan masih stabil dan tidak mengganggu hasil analisa.

Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitas (LOQ)

Hasil dari uji batas deteksi ini adalah 2,5 µg/mL dan batas kuantitas sebesar 8,36. Sehingga bisa dikatakan bahwa amoxicilin tidak akan terbaca lagi pada konsentrasi di bawah 2,50 µg/mL dan hasil tersebut terbukti.

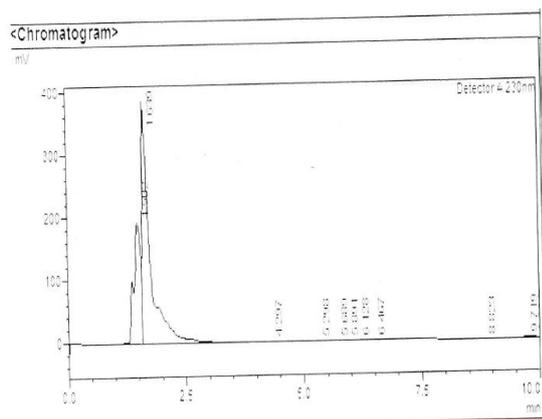
Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk memastikan kesesuaian dan keefektifan sistem yang digunakan agar diperoleh kondisi operasional dan kromatogram yang baik. Dari hasil percobaan diperoleh nilai rata-rata, yaitu jumlah plat teoritis 18,19, faktor

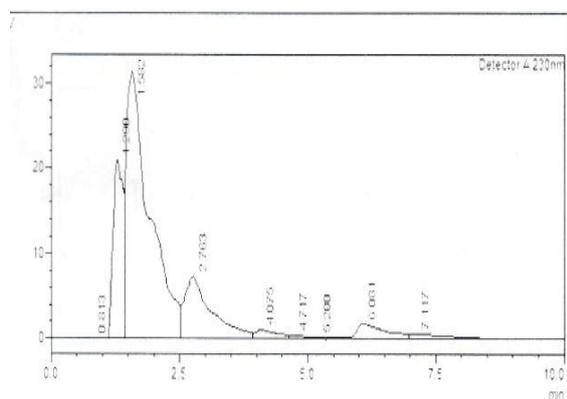
kapasitas 4,71, asimetris 0,70 dan %RSD (standar deviasi relatif) 15,35%. Berdasarkan hasil tersebut ada beberapa parameter yang tidak sesuai dengan persyaratan yaitu untuk plat teoritis yang dipersyaratkan >2500 sedangkan hasilnya <2500 dan untuk %RSD yang dipersyaratkan yaitu 5-15% (Gandjar & Rohman, 2007) sedangkan yang dihasilkan adalah 15,35%. Namun untuk faktor kapasistas dan faktor tailing (asimetris) telah sesuai. Ketidaksesuaian hasil plat teoritis disebabkan oleh perubahan HETP (lebar lempeng teoritis) dan juga pelebaran puncak.

Penetapan Kadar Amoxicilin

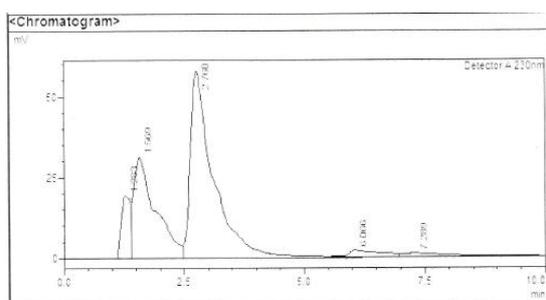
Pada penetapan kadar amoxicilin dalam plasma digunakan satu sampel darah yang diambil plasmanya kemudian dengan menggunakan dua konsentrasi yaitu konsentrasi 250 µg/mL dan 500 µg/mL. Dari setiap konsentrasi dilakukan pengulangan tiga kali. Untuk konsentrasi 250 µg/mL dihasilkan rata-rata puncak 441847,33, rata-rata waktu retensi 2,76 dan rata-rata kadar terukurnya 1,67. Sedangkan untuk konsentrasi 500 µg/mL rata-rata luas puncaknya 2069980,33, waktu retensinya 2,71 dan kadar terukurnya 3,88. Dari kedua konsentrasi tersebut terlihat bahwa pada konsentrasi 250 µg/mL nilai kadar terukur kurang dari LOD (2,50 µg/mL) sehingga pada konsentrasi tersebut tidak dapat terdeteksi sedangkan pada konsentrasi 500 µg/mL nilai kadar terukurnya lebih besar dari nilai LOD (2,50 µg/mL) sehingga dapat dikatakan pada konsentrasi tersebut amoxicilin dapat terdeteksi. Kadar amoxicilin yang terukur dalam plasma sangat sedikit, ini berarti amoxicilin memiliki bioavailabilitas yang sangat kecil dalam plasma sehingga konsentrasi yang digunakan harus tepat.



Gambar 6.6 kromatogram Blanko Darah



Gambar 6.7. Kromatogram sampel Darah + Amoxicilin konsentrasi 250 µg/mL



Gambar 6.8. Kromatogram sampel Darah + Amoxicilin konsentrasi 500 µg/mL

DAFTAR PUSTAKA

Ahmed, M., G.Babu, S., A.Sathish, K, S. 2011. Development and Validation of Amoxicillin by RP-HPLC Method in Bulk drug and Pharmaceutical dosage forms. *International Journal of*

KESIMPULAN

1. Kondisi optimasi untuk penetapan kadar amoxicilin secara KCKT dengan menggunakan kolom C18, kolom (250 X 4,6 mm, 5 µm) dengan fase gerak Metanol : Buffer kalium dihidrogen fosfat (10 : 90), PH 5 dan laju alir 2,0 mL/menit. Sedangkan hasil Validasi menunjukkan bahwa metode bioanalisis yang dilakukan sudah cukup memenuhi persyaratan untuk uji kesesuaian sistem, linearitas ($r=9,409$), akurasi ($\% \text{diff} \leq 15$ kecuali pada konsentrasi 3 µg/mL), presisi ($\% \text{RSD} \leq 15$), batas deteksi (2,5 µg/mL) dan batas kuantitas (8,36). Hanya saja ada beberapa konsentrasi yang belum sesuai yaitu pada uji akurasi. Namun secara keseluruhan metode yang telah divalidasi bisa digunakan untuk penetapan kadar amoxicilin.
2. Penetapan kadar Amoxicilin dalam plasma secara *in vitro* dengan menggunakan metode yang sudah divalidasi menunjukkan hasil kadar yang sangat rendah. Dan semakin rendah konsentrasi maka kadarnya semakin rendah ini karena bioavailabilitas amoxicilin dalam plasma darah sangat rendah sehingga jika menggunakan kadar yang sangat kecil kadar amoxicilin dalam plasma tidak dapat terukur.

ChemTech Research. IJCRGG, CODEN(USA). Vol. 3, No.3, pp 1037-1041.

Depkes RI.1984. *Farmakope Indonesia. Edisi III.* Departemen Kesehatan RI, Jakarta. Halaman 9, 31, 902.

- Dhoka, M., Gawande, V., Joshi, P. 2010. High performance Liquid Chromatographic Method For Determination Of Amoxicilin Trihydrate and Bromhexine Hydrochloride In Oral Dosage Forms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 2 : 129-133.
- Dirjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia, Edisi IV*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hal :1083, 1084.
- Gandjar, G.I., Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Harahap, Y. 2008. Validasi Metode Analisis Cilostazol dalam Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Program Sarjana Farmasi*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Jakarta. Hal:09-20.
- Hermita. 2004. Metode Penetapan Kadar Meloxicam dalam Darah Manusia In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Program Sarjana Farmasi*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Jakarta. Hal:79-92.
- Johnson, E.L., Stevenson; R . 1978. *Basic liquid chromatography*. Varian, California.
- Kelly MT. 1990. Drug Analysis in Biological Fluids. *Chemical Analysis in Complex Matrices*. Dublin, Ireland. Hal.17-97.
- Lestari Dewi. 2008. Validasi Metode Analisis Levofloksasin dalam Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UI, Depok.
- Martina Alfian.2009. Optimasi Fase Gerak Dapar Fosfat PH 4,4-Metanol Pada Penetapan Kadar Campuran Amoksisilin dan Kalium Klavulanat dalam Tablet Secara Simultan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Skripsi*. USU, Medan.
- Shargel, Leon; Andrew B.C.Yu. 1941. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Third edition*. Appleton, Lange. Hal: 33-110.
- Sudjadi dan Rohman. 2012. *Analisis Farmasi*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.