

Pengembangan Metode Hijau untuk Analisis Sulfametoksazol dan Trimetoprim Pada Produk Sultrim di Lembaga Farmasi Puskesmas, Bandung

TPH Simorangkir^{1*}, Iis Yuliani¹, Adhitami Kurnia Wulan Dewi²

¹Lembaga Farmasi Pusat Kesehatan Angkatan Darat, Bandung, Indonesia

²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia
Email: tphsimorangkirsimon@gmail.com

Abstrak

Sulfametoksazol dan trimetoprim yang saling berkombinasi memiliki efek sinergis karena kedua obat tersebut mempengaruhi bakteri folik sintesis asam. Kadar dari dua zat tersebut dapat dianalisa dalam suatu sampel dengan 2 metode menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yaitu metode I yang mengacu pada standar Farmakope Indonesia V dan metode II merupakan pengembangan dari metode dari perusahaan Thermo Fisher Scientific. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengembangkan metode analisis sulfametoksazol dan trimetoprim di produk Sultrim yang lebih efisien dan lebih ramah lingkungan. Fase gerak yang digunakan di metode I adalah campuran air:NEt₃:CH₃CN sedangkan di metode II adalah campuran buffer fosfat dan metanol yang lebih ramah lingkungan. Hasil penelitian menunjukkan waktu retensi sulfametoksazol dan trimetoprim dengan metode II lebih cepat dibandingkan dengan metode I dan juga biaya penelitian dengan metode II lebih sedikit dibandingkan metode I. Hasil validasi metode II setiap parameter validasi telah memenuhi syarat. Berdasarkan hasil penelitian, metode II lebih efisien dibandingkan dengan metode I dengan validasi yang memenuhi syarat.

Kata kunci: sulfametoksazol, trimetoprim, KCKT, efisiensi.

Abstract

The combined sulfamethoxazole and trimethoprim have a synergistic effect because the two drugs affect the synthesis of folic acid bacteria. The amount of these two substances can be analyzed in a sample with 2 methods using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), namely method I which refers to the Indonesian Pharmacope V standard and method II which is a development of the method of the Thermo Fisher Scientific company. The aim of this research is to develop a more efficient and more environmentally friendly method for sulfamethoxazole and trimethoprim analyses in Sultrim products. The mobile phase used in method I is a mixture of water:NEt₃:CH₃CN while in method II, which is considered as greener than that of method I, is a mixture of phosphate buffer and methanol. The results showed that the retention time of sulfamethoxazole and trimethoprim with method II was faster than method I and also the cost of the research with method II was less than method I. The results of validation in method II, each validation parameter met the requirement. Based on the research results, method II is more efficient than method I with validation that meets the requirements.

Keywords: sulfamethoxazole, trimethoprim, HPLC, efficiency.

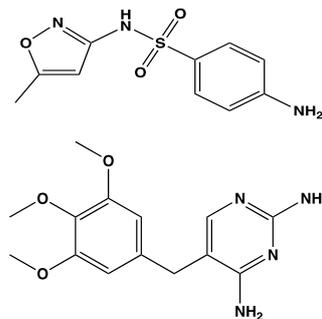
1. PENDAHULUAN

Sulfametoksazol atau 5-metil-3-sulfanilamidaisoksazol merupakan obat yang termasuk ke dalam golongan sulfonamida yang merupakan golongan antimikroba yang banyak digunakan pada manusia dan juga kedokteran hewan. Golongan sulfonamida merupakan agen pertama yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri [1]. Sulfametoksazol merupakan struktur analog dari asam amino benzoat yaitu *Para*

Amino Benzoic Acid (PABA). Obat ini juga termasuk inhibitor kompetitif enzim bakteri *dihydropteorate synthetase* yang bertanggung jawab untuk penggabungan *PABA dihydrofolic acid* (asam folat). Sulfametoksazol akan memblokir sintesis asam dihidrofolik dan mengurangi jumlah metabolisme asam tetrahidrofolat aktif yang merupakan kofaktor sintesis purin, timidin, dan DNA [2].

Trimetoprim atau 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoksibenzil)-pirimidin merupakan suatu basa lemah lipofilik yang memiliki sifat bakteriostatik dan secara struktural memiliki kemiripan dengan pirimetamin. Trimetoprim terikat reversibel dengan enzim bakteri dihidrofolat reduktase dan menghambat

aktivitasnya. Afinitas trimetoprim untuk enzim bakteri 100.000 kali lebih besar dari afinitasnya dengan enzim manusia [3]. Trimetoprim memberikan efeknya melalui proses biosintesis folat segera setelah sulfametoksazol bertindak, sehingga mendorong aksi yang sinergis antara kedua obat tersebut [1].



Gambar 1. Struktur molekul sulfametoksazol (atas) dan trimethoprim (bawah).

Penetapan kadar sulfametoksazol dan trimetoprim dengan KCKT dapat dilakukan dengan 2 metode, metode I yang mengacu pada standar Farmakope Indonesia V yaitu dengan menggunakan fase gerak campuran air, trietilamin, dan asetonitril [4] sedangkan metode II merupakan pengembangan dari metode yang ditemukan oleh perusahaan Thermo Fisher Scientific yaitu dengan menggunakan fase gerak campuran Buffer fosfat dan metanol [5]. Adanya pengembangan metode ini dikarenakan pada metode I yang menggunakan trietilamina sebagai salah satu fasa gerak akan menyebabkan waktu retensi dari sampel akan lebih lama karena trietilamina akan berinteraksi secara elektrostatis maupun hidrofobik dengan fase diam pada kolom C16 [6].

Kromatografi merupakan metode untuk pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen dalam fasa gerak dan fasa diam [7]. Salah satu jenis kromatografi yang banyak digunakan dalam melakukan analisa yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau dalam bahasa Inggris disebut *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Fase gerak yang digunakan yaitu pelarut atau campuran pelarut. Prinsip pemisahan dengan KCKT bermacam-macam tergantung pada bentuk dan karakter fasa diam maupun fasa gerak yang digunakan [8]. KCKT yang merefleksikan tekanan operasi tinggi yang dihasilkan oleh kolom awal. KCKT dapat diterapkan untuk analisis senyawa apapun dengan kelarutan dalam cairan yang dapat digunakan sebagai fase gerak. Komponen utama

dalam sistem HPLC yaitu pompa, injector, kolom detektor, dan sistem data [9]. Efisiensi kromatografi dapat dijelaskan oleh teori persamaan Van Deemter dimana interaksi analit dengan fasa diam dan fasa gerak, laju alir serta diameter partikel pengisi kolom mempengaruhi efisiensi kromatografi [10].

Perbandingan metode I dan II dalam kajian ini difokuskan pada perbandingan efisiensi waktu, biaya analisa, dan potensi bahaya dari bahan kimia yang digunakan.

2. METODE PENELITIAN

Analisis sulfametoksazol dan trimetoprim dilakukan dengan metode KCKT, yaitu metode I yang mengacu pada standar Farmakope Indonesia V dengan menggunakan kolom atau fasa diam C16 4,6x150 mm 3 μ m, eluen atau fasa gerak yaitu air:trietilamina:asetonitril (700:1:200) pH 5,9, dan laju alir 1,5 mL/menit [4]. Sedangkan, metode II, yang merupakan hasil pengembangan metode yang ditemukan oleh perusahaan Thermo Fisher Scientific, menggunakan kolom atau fasa diam C16 4,6x150 mm 3 μ m, eluen atau fasa gerak yaitu campuran buffer fosfat pH 2,7 dengan metanol (60:40), dan laju alir 0,8 mL/menit [5].

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan yaitu tablet sultrim yang diproduksi oleh Lembaga Farmasi Puskesmas, Bandung. Tablet sultrim sebanyak 20 tablet ditimbang dan digerus hingga halus, kemudian ditimbang sejumlah serbuk yang setara dengan 40

mg sulfametoksazol dan 8 mg trimetoprim. Setelah itu, sampel diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 50 mL dan disonikasi selama 10 menit. Lalu, sampel dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan fasa gerak yang sesuai baik untuk Metode I dan Metode II hingga tanda batas. Sulfametoksazol dan trimetoprim dalam sampel tablet sultrim selanjutnya dianalisa kadarnya dengan HPLC.

Uji Validasi

Uji validasi pada Metode II dilakukan dengan mengukur parameter akurasi, presisi, linearitas dan rentang, serta LOD dan LOQ. Pengujian akurasi dilakukan dengan mengukur tiga larutan uji dengan konsentrasi 80%, 100%, dan 120% untuk sulfametoksazol dan trimetoprim dan menghitung perolehan kembali. Pengujian presisi yang dilakukan ada 2 jenis yaitu presisi keterulangan dan presisi antara. Pada pengujian presisi keterulangan, 6 sampel larutan uji sulfametoksazol dan trimetoprim dilakukan pada hari ke 1 uji presisi. Pada pengujian presisi antara, 6 sampel larutan uji sulfametoksazol dan trimetoprim dilakukan oleh analis yang berbeda pada hari ke 1 uji presisi. Pengujian linearitas dan rentang dilakukan dengan menyuntikkan 7 larutan yang mengandung larutan standar sulfametoksazol dan trimetoprim dengan rentang konsentrasi 70 sampai 130% ke dalam sistem HPLC. Selanjutnya dilakukan penentuan LOD dan LOQ dengan mengukur 7 sampel yang setara dengan 40 mg sulfametoksazol dan 8 mg

trimetoprim dengan rentang konsentrasi 70 sampai 130%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil Analisa Sulfametaksol dan Trimetoprim
Hasil pengujian sulfametoksazol dan trimetoprim dalam larutan sampel dengan metode I berurutan disajikan di Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil Pengujian Larutan Sampel Sulfametoksazol Metode I

Larutan	Waktu Retensi	Area	Kadar (%)
Sampel 1	7,319	6.121.293	98,91
Sampel 2	7,309	6.075.492	98,17
Sampel 3	7,286	6.101.245	98,59
Sampel 4	7,271	6.117.917	98,86
SD	0,022	20.921	0,34
Rata-rata	7,296 ± 0,022	6.103.987 ± 20.921	98,63 ± 0,34

Tabel 2. Hasil Pengujian Larutan Sampel Trimetoprim Metode I

Larutan	Waktu Retensi	Area	Kadar (%)
Sampel 1	3,339	511.668	98,26
Sampel 2	3,340	512.415	98,40
Sampel 3	3,340	508.665	97,68
Sampel 4	3,340	510.302	98,00
SD	0,0005	1.649	0,32
Rata-rata	3,340 ± 0,0005	510.763 ± 1649	98,09 ± 0,32

Hasil pengujian larutan sulfametoksazol dan trimetoprim dalam larutan sampel dengan metode II secara berurutan disajikan di Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Hasil Pengujian Larutan Sampel Sulfametoksazol Metode II

Larutan	Waktu Retensi	Area	Kadar (%)
Sampel 1	6,223	949.864	97,03
Sampel 2	6,223	950.995	97,15
Rata-rata	6,223	950.429	97,09

Tabel 4. Hasil Pengujian Larutan Sampel Trimetoprim Metode II

Larutan	Waktu Retensi	Area	Kadar (%)
Sampel 1	2,585	104.215	97,76
Sampel 2	2,587	104.243	97,78
Rata-rata	2,586	104.229	97,77

Berdasarkan data di Tabel 1-4, kadar sulfametoksazol dan trimetoprim dengan kedua metode berada di kisaran 97-99%, dimana secara

umum metode II menghasilkan nilai yang lebih rendah daripada metode I. Selain itu, metode I memberikan rata – rata waktu retensi untuk sulfametoksazol dan trimetoprim berturut-turut sebesar 7,296 ± 0,022 menit dan 3,340 ± 0,0005 menit. Sedangkan pada metode II diperoleh rata – rata waktu retensi untuk sulfametoksazol dan trimetoprim berturut-turut sebesar 6,223 menit dan 2,586 menit. Waktu retensi dengan metode I lebih lama dibandingkan dengan waktu retensi dengan metode II karena metode I menggunakan fasa gerak trietilamina (N(CH₂CH₃)₃) yang berinteraksi lebih kuat saat berada di dalam kolom dibandingkan dengan interaksi di metode II antara fasa gerak dengan kolom C16.

Secara teori, trietilamina akan berinteraksi dengan fasa diam secara elektrostatis maupun interaksi hidrofobik. Interaksi elektrostatis terjadi

karena nitrogen dari trietilamin yang bermuatan positif berinteraksi dengan oksigen dari gugus silanol pada fasa diam yang bermuatan negatif. Interaksi hidrofobik terjadi karena adanya ikatan hidrogen antara trietilamin dengan fasa diam. Selain itu, amina yang ditambahkan ke dalam eluen akan berfungsi sebagai *masking agents* dan dapat bersaing dengan analit untuk silanol pada permukaan silika fase diam. Adanya pembentukan kompleks silanol-amina akan menyebabkan terjadinya peningkatan waktu retensi sesuai dengan rumus $t_R = t_S + t_H$, dimana t_H adalah waktu retensi ketika tidak adanya efek silanol dan t_S adalah peningkatan waktu retensi dengan adanya amina [6].

Sedangkan pada metode II fasa gerak/eluen hanya akan berinteraksi secara elektrostatis dan hidrofobik dengan fasa diam. Interaksi elektrostatis terjadi pada silanol yang bermuatan negatif dengan oksigen pada fosfat yang bermuatan negatif. Interaksi hidrofobik terjadi karena adanya ikatan hidrogen antara alkil pada fasa diam dan oksigen dari fasa gerak yaitu fosfat dan metanol. Ditinjau dari hal tersebut metode II lebih efisien dalam hal waktu analisa dibandingkan dengan metode I.

3.2. Uji Validasi

Parameter yang diuji yaitu akurasi, presisi, linearitas dan rentang, serta LOD dan LOQ. Hasil validasi (Tabel 6) dengan parameter akurasi yaitu tiga larutan uji dengan konsentrasi (a) Sulfametoksazol dan (b) Trimetoprim masing-masing 80%, 100%, dan 120% yang diuji masing-masing 3 kali. Tabel 6 menunjukkan hasil perolehan kembali rata-rata yaitu 100,08% dengan nilai RSD yaitu 0,54%. Hasil tersebut telah sesuai dengan syarat kriteria keberterimaan yaitu nilai perolehan kembali 98%-102% dan $RSD \leq 2\%$ [11].

Validasi dengan uji presisi yang diperoleh dari 2 jenis pengujian yaitu keterulangan dan presisi antara (Tabel 7 sampai Tabel 10) menunjukkan hasil yang sangat baik yaitu untuk keterulangan dari hasil 6 pengujian menunjukkan RSD 0,53% untuk sulfametoksazol dan RSD 0,90% untuk trimetoprim. Hasil pengujian presisi antara menghasilkan nilai RSD 0,61% untuk sulfametoksazol dan 0,93% untuk trimetoprim. Hasil dari kedua jenis pengujian presisi tersebut telah sesuai dengan kriteria keberterimaan yaitu nilai $RSD \leq 2\%$ [11].

Tabel 6. Hasil Pengujian Akurasi

Larutan	Area Terdekteksi	Konsentrasi hasil analisa (%)	Hasil perolehan Kembali (%)	RSD tiap Konsentrasi
Standar	(a) 989347	100,00		
	(b) 108050	100,00		
80%	(a) 797429	80,00	100,00	0,36
	797162	80,57	100,71	
	795245	80,38	100,47	
	(b) 86087	80,00	100,00	0,40
	85848	79,45	99,31	
	85838	79,44	99,30	
100%	(a) 997546	100,83	100,83	0,48
	992640	100,33	100,33	
	989010	99,88	99,88	
	(b) 106682	98,73	98,73	0,69
	106761	98,81	98,81	
	106422	99,96	99,96	
120%	(a) 1205942	121,89	101,57	0,64
	1194634	120,75	101,62	
	1192681	120,42	100,35	
	(b) 129813	120,14	100,12	0,66
	128532	118,96	99,13	
	128356	120,45	100,37	

Tabel 7. Hasil Pengujian Presisi Keberulangan Sulfametoksazol

No. Sampel	Area terdeteksi	Konsentrasi (%)
1	982869	99,65
2	984391	99,81
3	995049	100,89
4	992933	100,67
5	992852	100,66
6	985942	99,96
Standard Deviation (SD)		0,53
Rata-rata Konsentrasi		100,27
RSD		0,53

Tabel 8. Hasil Pengujian Presisi Keberulangan Trimetoprim

No. Sampel	Area terdeteksi	Konsentrasi (%)
1	107952	100,83
2	107974	100,85
3	109185	101,98
4	106592	99,56
5	106636	99,60
6	107807	100,70
Standard Deviation (SD)		0,91
Rata-rata Konsentrasi		100,59
RSD		0,90

Tabel 9. Hasil Pengujian Presisi Antara Sulfametoksazol

No. Sampel	Area terdeteksi	Konsentrasi (%)
1	982638	99,47
2	991472	100,36
3	1000708	101,30
4	992137	100,43
5	987241	99,94
6	992027	100,42
Standard Deviation (SD)		0,61
Rata-rata Konsentrasi		100,32
RSD		0,61

Tabel 10. Hasil Pengujian Presisi Antara Trimetoprim

No. Sampel	Area terdeteksi	Konsentrasi (%)
1	107615	100,68
2	105972	99,15
3	106878	99,99
4	108575	101,58
5	107309	100,40
6	106000	99,17
Standard Deviation (SD)		0,94
Rata-rata Konsentrasi		100,16
RSD		0,93

Parameter selanjutnya yaitu linearitas dan rentang dengan hasil yang dapat ditunjukkan pada Tabel 11 untuk sulfametoksazol dan Tabel

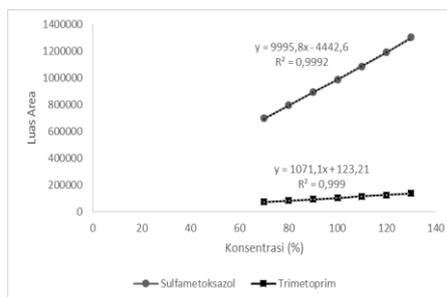
12 untuk trimetoprim. Kurva linearitas sulfametoksazol dan trimetoprim disajikan di Gambar 2.

Tabel 11. Hasil Pengujian Linearitas Sulfametoksazol

Konsentrasi (%)	Area Terdekteksi
70	699408
80	797429
90	895124
100	989010
110	1087631
120	1192681
130	1304679
Regresi :	Y = a + bX a = -4442,6 b = 9995,8 r ² = 0,9992

Tabel 12. Hasil Pengujian Linearitas Trimetoprim

Konsentrasi (%)	Area Terdekteksi
70	75724
80	86087
90	96267
100	106422
110	117257
120	128356
130	140517
Regresi :	Y = a + bX a = 123,21 b = 1071,1 r ² = 0,999



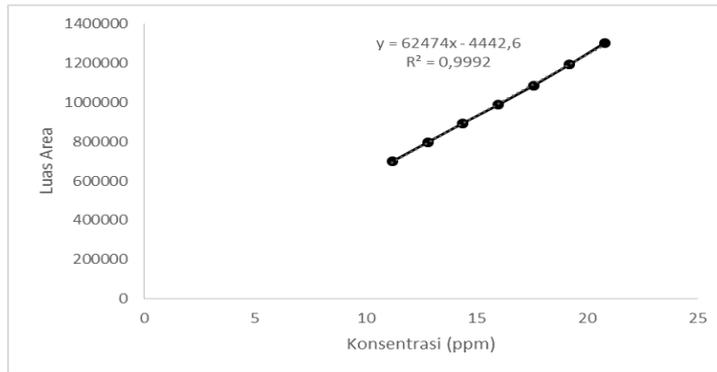
Gambar 2. Kurva Linearitas Sulfametoksazol dan Trimetoprim

Parameter terakhir yaitu LOD dan LOQ. Hasil pengujian Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantisasi (LOQ) ditunjukkan pada Tabel 13 untuk sulfametoksazol dan Tabel 14 untuk

trimetoprim. Sedangkan kurva hubungan konsentrasi dengan luas area dapat ditunjukkan pada Gambar 3 untuk sulfametoksazol dan Gambar 4 untuk trimetoprim.

Tabel 13. Hasil Pengujian LOD dan LOQ Sulfametoksazol

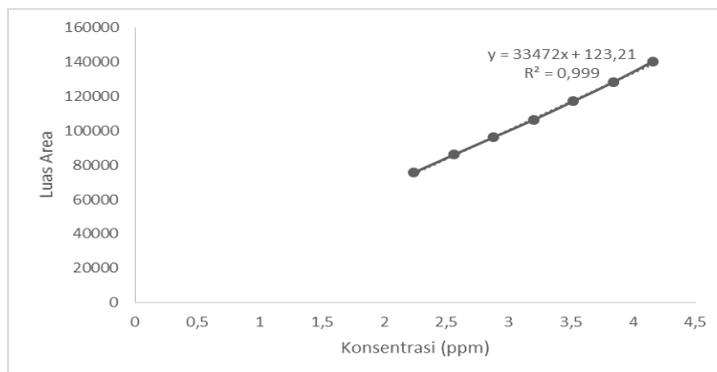
No.	Konsentrasi (ppm)	Area (Y)	Yi	(Y-Yi)	(Y-Yi) ²
1	11,2	699408	695266,2	4141,8	17154507
2	12,8	797429	795224,6	2204,4	48593
3	14,4	895124	895183	-59	3481
4	16,0	989010	995141,4	-6131,4	37594066
5	17,6	1087631	1095100	-7468,8	55782973
6	19,2	1192681	1195058	-2377,2	5651080
7	20,8	1304679	1295017	9662,4	93361974
				Σ (Y-Yi) ²	214407461



Gambar 3. Kurva Hubungan Konsentrasi dan Luas Area Sulfametoksazol

Tabel 14. Hasil Pengujian LOD dan LOQ Trimetoprim

No.	Konsentrasi (ppm)	Area (Y)	Yi	(Y-Yi)	(Y-Yi) ²
1	2,24	75724	75100,49	623,51	388765
2	2,56	86087	85811,53	275,47	75884
3	2,88	96267	96522,57	-255,57	65316
4	3,2	106422	107233,6	-811,61	658711
5	3,52	117257	117944,7	-687,65	472863
6	3,84	128356	128655,7	299,69	89814
7	4,16	140517	139366,7	1150,27	1323121
$\sum (Y-Y_i)^2$					3074473



Gambar 4. Kurva Hubungan Konsentrasi dan Luas Area Trimetoprim

Hasil pengujian linearitas dan rentang memberikan hasil yang linear ($r^2 = 0,999$) pada rentang kadar 70 – 130%. Selanjutnya dapat dihitung bahwa metode II memiliki nilai LOD = 0,34 ppm dan LOQ 1,05 ppm untuk sulfametoksazol, dan LOD = 0,08 ppm dan LOQ = 0,23 ppm untuk trimetoprim.

Secara umum, metode I menggunakan fase gerak dari bahan kimia yang sedikit lebih berbahaya daripada metode II, misalnya basa lemah trietilamina yang bersifat beracun dan

korosif. Sedangkan dalam hal anggaran biaya bahan kimia untuk analisa (per akhir 2020 berdasarkan laman Fischer Scientific), metode I memerlukan biaya operasional yang lebih tinggi daripada biaya di metode II (Tabel 15). Meskipun demikian, perlu diketahui bahwa harga bahan kimia di Indonesia fluktuatif sehingga anggaran biaya ini dapat berubah sewaktu-waktu. Ketersediaan bahan kimia di metode II juga lebih baik daripada di metode I.

Tabel 15. Perbandingan Biaya Penelitian antara Metode I dan Metode II

Bahan	Metode I	Metode II
Asetonitril	200 mL (Rp 264.835)	-
Trietilamina	1 mL (Rp 3.955)	-
Metanol	150 mL (Rp 65.871)	550 mL (Rp 241.527)
KH ₂ PO ₄	-	2,7 gram (Rp 3.741)
Total	Rp 334.661	Rp 245.268

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa analisa KCKT sulfametoksaol dan trimetoprim dalam produk sulprim dengan metode II dapat menghasilkan data yang memenuhi standar validasi dengan waktu retensi yang lebih pendek daripada metode I. Selain itu, metode II menggunakan bahan kimia yang lebih hijau untuk operasional kolom dan lingkungan dengan ketersediaan dan harga yang lebih terjangkau, sehingga metode II dapat digunakan sebagai alternatif pengganti metode I yang lebih ramah lingkungan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Kepala Lembaga Farmasi Pusat Kesehatan Angkatan Darat dan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian PKL. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Dr. Yuniar Ponco Prananto, MSc selaku pembimbing PKL.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Tahan, G.P., Machado, S.C., Malaguti, E.C., Maia, P.P., Rath, S., Martins, I. 2015. **RP-LC Method For Simultaneous Determination Of Sulfamethoxazole And Trimethoprim Content In Veterinary Drugs**. *Eletica Quimica*. 40. 32–41.

[2] Liu, T., Wang, B., Guo, J., Zhou, Y., Julius, M., Njire, M., et al. 2015. **Role of folP1 and folP2 Genes In The Action of Sulfamethoxazole and Trimethoprim Against Mycobacteria**. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25. 1559–1567.

[3] Fernández-Villa, D., Aguilar, M.R., Rojo, L. 2019. **Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications**.

International Journal of Molecular Sciences. 20. 1–30.

[4] Kementerian Kesehatan RI. 2014. **Farmakope Indonesia V**. Jakarta.

[5] Scientific T.F. 2015. **Enhanced Gradient Resolution of Sulfa Drugs**. Waltham: Thermo Fisher Scientific.

[6] Gasco-Lopez, A., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R. 1997. **The Effect of Different Amines Added to Eluents as Silanol Masking Agents on the Chromatographic Behavior of Some Diuretics in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using C Packings**. *Journal of Chromatographic Science*. 35 (11). 525–535.

[7] Rizalina, H., Cahyono, E., Mursiti, S., Nurcahyo, B. 2018. **Optimasi Penentuan Kadar Metanol dalam Darah Menggunakan Gas Chromatography**. *Indonesian Journal of Chemical Science*. 7. 254–261.

[8] Rubiyanto, D. 2016. **Teknik Dasar Kromatografi**. Deepublish. Yogyakarta.

[9] Rounds, M.A., Reuhs, B.L. 2010. **Chapter 28. High-Performance Liquid Chromatography**, dalam *Food Analysis*, 4th ed. (eds. Nielsen, S.S.). Springer Science + Business Media, LLC, New York. 499–512.

[10] Raeni, S.F., Haresmawati, U., Mulyasuryani, A., Sabarudin, A. 2018. **Evaluasi Pemisahan Alkilbenzena Menggunakan Kolom Monolith Berbasis Polimer Organik secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*. 14. 37–50.

[11] BPOM RI. 2012. **Petunjuk Operasional Penerapan Pedoman Cara Pembuatan Obat Yang Baik**. Jakarta.