

VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR ASIKLOVIR DALAM SEDIAAN SALEP MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Anita Dwi Puspitasari^{1*}, Sumantri², Putri Nara Aqidah Pawae¹

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim
Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang 50236.

² Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
Sinduadi, Mlati, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281
*Email: anita@unwahas.ac.id

Abstrak

*Asiklovir merupakan derivat guanosin yang berkhasiat untuk pengobatan infeksi virus herpes. Namun penelitian tentang validasi metode penetapan kadar acyclovir masih jarang dilakukan, maka perlu adanya pengembangan. Tujuan penelitian ini adalah melakukan validasi metode penetapan kadar asiklovir menggunakan KCKT dan aplikasinya dalam sediaan salep. Validasi penetapan kadar salep asiklovir menggunakan KCKT dengan kolom C₁₈ dan fase gerak hasil optimasi campuran asetonitril:asam fosfat (80:20 v/v) dan detektor uv-visibel 254 nm. Uji validasi yang dilakukan meliputi akurasi, presisi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas. Metode tervalidasi diaplikasikan pada penetapan kadar salep asiklovir. Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji validasi memenuhi persyaratan sebagai berikut : Uji akurasi dengan perolehan kembali 99,603-101,800 %, uji presisi dengan nilai RSD 0,302 %, selektivitas yang baik, linieritas dengan nilai korelasi (*r*) 0,9998, LOD sebesar 0,282 µg/mL dan LOQ sebesar 0,635 µg/mL. Hasil penetapan kadar menggunakan metode KCKT pada sediaan salep diperoleh hasil 104,632%. Hal ini memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan Farmakope Indonesia Edisi V (2014).*

Kata kunci: asiklovir, salep, validasi

PENDAHULUAN

Berbagai infeksi virus pada manusia disebabkan oleh virus herpes. Infeksi dari virus herpes dapat disembuhkan oleh salep asiklovir. Salep asiklovir merupakan derivat guanosin berkhasiat spesifik terhadap virus herpes tanpa mengganggu fisiologi sel-sel normal.

Salepasiklovir sering digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan penyakit herpes. Hal ini dikarenakan harganya yang murah dan mudah didapat. Namun penelitian tentang validasi asiklovir dalam sediaan salep masih sangat jarang dilakukan, dan kadar asiklovir dalam sediaan salep sangat kecil yaitu 50 mg dalam 1 gram salep, oleh karena itu perlu dikembangkan. Salah satu pengujian dengan metode yang selektif dan sensitif seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) diperlukan untuk menganalisis kadar asiklovir.

Pengembangan dan validasi metode RP-HPLC untuk penentuan valasiklovir hidroklorida dan subtansinya yang terkait dalam formulasi tablet 500 mg yang dilakukan Bhavar, et al (2013) menggunakan fase diam ukuran 150 x 4,0 mm, fase gerak campuran asam fosfat 1 % dan metanol (90:10) serta menggunakan detektor UV pada panjang

gelombang 254 nm memberikan hasil akurasi presisi, linieritas dan reproduksibilitas yang baik. Tetapi dalam penelitian ini tidak dilakukan uji sensitivitas sehingga LOD dan LOQ tidak diketahui. Validasi metode ini tidak bisa dikatakan valid karena tidak memenuhi salah satu parameter yaitu sensitivitas

Penetapan kadar asiklovir dapat menggunakan metode KCKT dengan fase diam C₁₈ dengan ukuran 250 mm x 4.6 mm dan fase gerak campuran ammonium asetat pH 4.0 dan asetonitril pada perbandingan 40:60 v/v. Penelitian yang dilakukan menghasilkan sensitivitas, selektivitas, reproduktifitas, akurasi, presisi, linieritas, stabilitas, dan spesifikasi (Muralidharan, et al, 2014). Penelitian ini tidak dilakukan optimasi fase gerak campuran ammonium asetat pH 4.0 dan asetonitril pada berbagai konsentrasi. Hal ini akan merusak hasil analisis penetapan kadar asiklovir dalam sediaan salep.

Deteksi dan penentuan asiklovir secara kuantitatif dan kualitatif dalam sediaan tablet sebagian besar dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi reverse phase (RP-HPLC). Sebelum dilakukan penetapan kadar asiklovir, metode ini harus di validasi

terlebih dahulu. Validasi metode ini harus memenuhi persyaratan yaitu presisi, akurasi, linearitas, selektivitas, dan sensitivitas (Harmita, 2004).

Sehubungan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi penetapan kadar asiklovir secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menggunakan fase diam C_{18} dan fase gerak asetonitril:asam fosfat dengan perbandingan (80:20;75:25 dan 70:30) v/v serta mengaplikasikannya dalam sediaan salep.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah baku pembanding asiklovir (Phapros), metanol grade HPLC 100% (merck), aquabidest, asam fosfat 85 %, asam klorida pekat, asetonitril, es batu dan salep yang mengandung asiklovir 250 mg.

Alat-alat yang digunakan yaitu Seperangkat KCKT (Jasco) terdiri dari pompa (PU 2080 plus), injektor manual, kolom C_{18} lichrosper 100, *reverse phase* C_{18} (100 mm x 4,6 mm ID, 5 μ m), detektor UV (2070 plus), dan pengolah data pada komputer (Ezchromelite), spektrofotometer UV-Vis (1800 Shimadzu), syringe (Hamilton), timbangan analitik (Ohaus), penyaring eluen (Whatman), digital ultrasonic cleaner (Jeken), mikropipet (Socorex), dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analitik.

Pembuatan Larutan Stok Baku Asiklovir

Ditimbang asiklovir sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan kedalam labu ukur 250 ml. Kemudian ditambahkan dengan fase gerak asam fosfat : asetonitril (80:20 v/v) sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 200 μ g/ml (Ravisankar, et al, 2015).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan stok baku asiklovir 200 μ g/ml dipipet 100 μ L kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL. Kemudian diencerkan dengan metanol sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan asiklovir 2 μ g/ml. Larutan *discanning* menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 200-300 nm. Setelah itu dipilih panjang gelombang yang maksimum.

Pembuatan Fase Gerak

Pembuatan fase gerak dengan perbandingan asetonitril:asam fosfat = 80:20

v/v dibuat dengan cara sebanyak 200 ml asetonitril dimasukkan ke dalam labu takar 250 ml. Kemudian sebanyak 50 ml asam fosfat ditambahkan kedalam labu takar berisi asetonitril, lalu dihomogenkan dengan digital ultrasonic cleaner pada suhu 30°C selama 15 menit.

Pembuatan fase gerak dengan perbandingan asetonitril:asam fosfat= 75:25 v/v dibuat dengan cara sebanyak 187,5 ml asetonitril dimasukkan kedalam labu takar 250 ml. Kemudian sebanyak 62,5 ml asam fosfat ditambahkan kedalam labu takar berisi asetonitril, lalu dihomogenkan dengan digital ultrasonic cleaner pada suhu 30°C selama 15 menit.

Pembuatan fase gerak dengan perbandingan asetonitril:asam fosfat=70:30 v/v dibuat dengan cara sebanyak 175 ml asetonitril dimasukkan kedalam labutakar 250 ml. Kemudian sebanyak 75 ml asam fosfat ditambahkan kedalam labu takar berisi asetonitril, lalu dihomogenkan dengan digital ultrasonic cleaner pada suhu 30°C selama 15 menit (Bhavar, et al, tahun 2014).

Optimasi Fase Gerak

Optimasi campuran fase gerak terdiri dari asetonitril:asamfosfat dengan perbandingan asetonitril:asam fosfat(80:20 v/v); asetonitril:asam fosfat(75:25 v/v) dan asetonitril:asam fosfat (70:30 v/v). Kemudian dipilih perbandingan fase gerak yang memberikan hasil resolusi yang terbaik. Laju alir yang digunakan adalah 1 mL/minit (Ravisankar et al, 2015).

Pembuatan Kurva Baku

Larutan stok baku asiklovir 200 μ g/mL dipipet sebanyak 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L, dan 600 μ L, masing-masing dimasukkan kedalam labu takar 10 mL. Kemudian masing-masing larutan stok tersebut ditambah fase gerak campuran asetonitril:asamfosfat (80:20 v/v) sampai tanda batas dan kocok hingga homogen sehingga diperoleh kadar Asiklovir 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 6 μ g/mL, 8 μ g/mL, 10 μ g/mL, 12 μ g/mL. Lalu masing-masing larutan disaring dengan membrane penyaring nylon 0,2 μ m, dan diinjeksikan kesistem KCKT dengan volume penyuntikan 20 μ L (Ravisankar,et al, 2015).

Validasi

a. Uji Ketelitian

Larutan yang mengandung Asiklovir 10 $\mu\text{g/mL}$ diinjeksikan sebanyak 20 μL ke alat KCKT. Uji ini dilakukan replikasi sebanyak 6 kali. Kemudian dicacat hasil uji berupa luas area, waktu retensi, lebar dan tinggi puncak. Selanjutnya dihitung presentase koefisien variasinya.

b. Uji Ketepatan

Uji ketepatan dilakukan dengan metode penambahan baku (*standard addition method*) yaitu dengan membuat 3 konsentrasi analit sampel dengan penambahan baku 80 % setara dengan 40 $\mu\text{g/mL}$, 100% setara dengan 50 $\mu\text{g/mL}$ dan 120% setara dengan 60 $\mu\text{g/mL}$, dimana masing-masing dilakukan 3 kali replikasi. Masing-masing sebanyak 20 μL diinjeksikan kedalam KCKT.

c. Uji Linieritas

Larutan baku Asiklovir dengan konsentrasi 2; 4; 6; 8; 10 dan 12 $\mu\text{g/mL}$, diinjeksikan sebanyak 20 μL ke alat KCKT. Luas area dari puncak Asiklovir yang diperoleh setiap konsentrasinya dibuat persamaan regresi linier, dan dihitung koefisien korelasinya. Uji linieritas dilakukan 3 kali pengulangan. Persamaan garis linier yang paling baik digunakan sebagai persamaan kurva baku dalam menetapkan kadar sampel.

d. Uji Selektivitas

Larutan yang mengandung Asiklovir diinjeksikan sebanyak 20 μL ke alat KCKT. Berdasarkan kromatogram dapat dilihat puncak analit Asiklovir dan komponen lainnya dalam salep dapat terpisah dengan sempurna. Selektivitas metode dapat ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (Rs).

e. Uji Sensitivitas

Larutan yang mengandung Asiklovir konsentrasi 2; 4; 6; 8; 10; dan 12 $\mu\text{g/mL}$ diinjeksikan sebanyak 20 μL ke alat KCKT. Uji sensitivitas dinyatakan dengan uji batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantifikasi metode dihitung secara statistik menggunakan persamaan garis regresi linier yang diperoleh dari uji linieritas.

Penetapan Kadar Asiklovir dalam Sediaan Salep

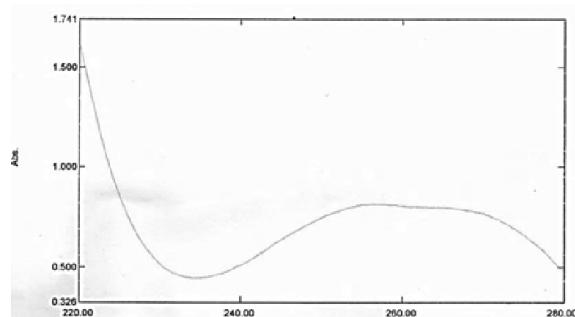
Proses ekstrasi dilakukan dengan cara Asiklovir ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian dilarutkan dengan 50 ml aquabidest

suasana asam HCl. Lalu dipanaskan larutan dalam tabung reaksi selama beberapa menit, setelah itu dibekukan dengan es. Untuk memisahkan zat maka disentrifugasi pada 30 rpm selama 15 menit. Disaring masing-masing dengan membrane filter 0,45 μm . Kemudian larutan sampel diambil 1 ml diarutkan dengan fase gerak sebanyak 50 ml. Sampel dianalisis dengan menggunakan KCKT dengan fase gerak asetonitril:asam fosfat (80:20 v/v) dan fase diam C₁₈. Detektor diatur pada panjang gelombang 254 nm. Sebanyak 20 μL diinjeksikan dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Penetapan kadar sampel dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan untuk salep sampel. Dihitung kadar Asiklovir dengan mensubstitusikan luas area sampel Y kedalam persamaan regresi linier $y=bx+a$ (Ravisankar, et al 2015 dan Ghosh, et al, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Hasil scanning larutan asiklovir menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 254,90 nm. Panjang gelombang maksimum larutan asiklovir dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Scanning Panjang Gelombang Maksimum Asiklovir Menggunakan Spektrofotometri UV

Panjang gelombang maksimum tersebut sama dengan penelitian yang dilakukan Somsuhbra G., et al (2015) yaitu larutan asiklovir menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 254 nm.

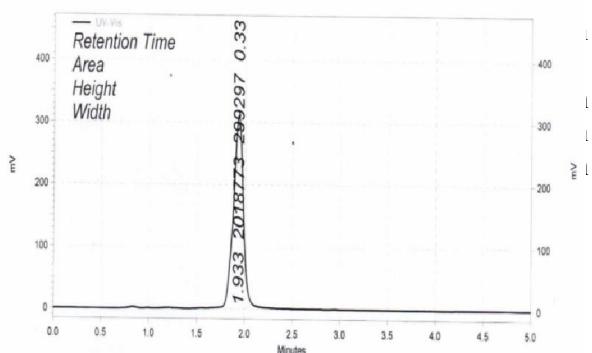
Optimasi Komposisi Fase Gerak

Optimasi fase gerak dilakukan dengan merubah perbandingan fase gerak sehingga mampu ditemukan komposisi fase gerak umumnya yang tepat untuk asiklovir yaitu

campuran asetonitril : asam fosfat dengan perbandingan 80:20 v/v, 75:25 v/v dan 70:30 v/v. Deteksi dilakukan dengan panjang gelombang 254,90 nm dan laju alir 1 ml/menit. Hasil optimasi komposisi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 1 dan kromatogram fase gerak optimum dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Hasil Optimasi Komposisi Fase Gerak

Komposisi fase gerak (asam fosfat:asetonitril)	RT (menit)	Luas puncak	Keterangan
80:20	1,933	2018773	Optimum
75:25	2,033	1879095	
70:30	2,023	1734538	

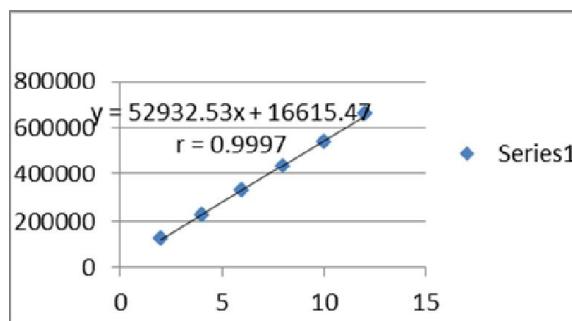


Gambar 2. Kromatogram Hasil Optimasi Komposisi Fase Gerak Optimum Asetonitril:Asam Fosfat (80:20 v/v)

Fase gerak yang terpilih adalah fase gerak dengan perbandingan asetonitril:asam fosfat (80:20 v/v) karena memiliki waktu retensi yang cepat, luas puncak yang cukup luas dan puncak yang simetris.

Pembuatan Kurva Baku Asiklovir

Kurva baku menghasilkan persamaan regresi linier $y = 52932.53x + 16615.47$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9997$. Grafik kurva baku asiklovir dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik Kurva Baku Asiklovir

Grafik diatas menunjukkan linieritas yang mendekati angka 1 yaitu 0.9997 dengan sumbu Y adalah luas puncak area kromatogram asiklovir dan sumbu X adalah kadar.

Uji Validasi

a. Uji Ketelitian (Presisi)

Uji presisi ditentukan berdasarkan nilai RSD (*Relative Standard Deviasi*), uji ketelitian menghasilkan nilai RSD sebesar 0,302 %. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa metode analisis yang divalidasi memenuhi persyaratan nilai RSD dan menunjukkan ketelitian yang baik yaitu nilai RSD kurang dari 2% (Harmita, 2004). Hasil uji ketelitian asiklovir dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Ketelitian (Presisi)

kadar (ppm)	waktu retensi (menit)	luas area	tinggi puncak	Kadar
10	1.910	437868	79047	7.96
10	1.197	439230	85522	7.98
10	1.917	436521	85441	7.93
10	1.910	436824	79031	7.94
10	1.910	436602	78963	7.93
10	1.917	439230	85522	7.98
Rata-rata				7.96
SD				0.02
% RSD				0.302%

b. Uji Ketepatan (Akurasi)

Uji akurasi ditentukan melalui uji perolehan kembali dengan metode penambahan bahan baku pada analit. Perolehan kembali dihitung dengan membandingkan jumlah asiklovir terukur untuk masing-masing penambahan baku terhadap kadar baku asiklovir yang ditambahkan. Untuk asiklovir, nilai range akurasinya yaitu antara 98-

102%. Hasil perolehan kembali pada tingkat tiga kosentrasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Akurasi Asiklovir

sampel : bahan baku	Replikasi	Perolehan kembali (%)	Rata-rata	D	RSD
100:80	1	101.584	101.292	0.262	0.258%
	2	101.203			
	3	101.089			
100:100	1	101.981	101.788	0.180	0.177%
	2	101.612			
	3	101.799			
100:120	1	99.631	99.603	0.023	0.023%
	2	99.582			
	3	99.598			

keterangan :

A = kosentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan bahan baku (total)

B = kosentrasi sampel sebelum penambahan bahan baku

C = kosentrasi bahan baku yang ditambahkan

c. Linieritas

Uji linieritas dilakukan pada 6 konsentrasi asiklovir yaitu 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 $\mu\text{g/mL}$ dengan melakukan replikasi sebanyak 3 kali. Hasil uji linieritas dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Linieritas

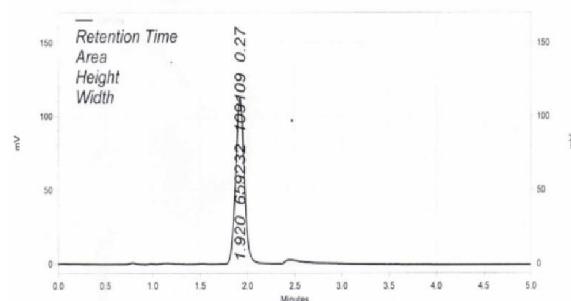
Replikasi	Regresi linier
1	a = 14355.93 b = 53320.98 r = 0,9996
2	a = 17476.13 b = 52501.31 r = 0,9998
3	a = 10768.33 b = 54125 r = 0,9995

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa ketiga garis regresi linier menunjukkan korelasi yang baik dengan koefisien korelasi (r) memenuhi kriteria yang dimana nilai r dapat diterima yaitu r +1 atau -1 (Harmita, 2004). Persamaan garis regresi yang

paling baik berdasarkan nilai r adalah $y = 52932.53x+16615.47$; $r = 0.9997$.

d. Selektivitas

Selektivitas dapat dinyatakan dengan derajat penyimpangan dari metode yang dilakukan terhadap larutan pembanding yang mengandung bahan yang ditambahkan. Semakin besar nilai resolusi maka pemisahan komponen-komponen yang terelusi dengan waktu retensi yang berdekatan semakin efisien. Hasil kromatogram asiklovir dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil kromatogram asiklovir

Berdasarkan hasil kromatogram diatas diketahui bahwa hanya ada 1 puncak saja dari asiklovir yang dapat diukur sedangkan komponen lain tidak ada yang terukur. Metode analisis memiliki selektivitas yang baik karena dapat mengukur asiklovir secara tepat.

e. Sensitivitas

Uji sensitivitas dinyatakan dengan uji batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantifikasi dihitung berdasarkan hasil dari persamaan garis regresi linier, yaitu $y = 52501.31x + 17476.13$ dan koefisien korelasi (r) = 0.9998. LOD menunjukkan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang mampu dideteksi dengan persamaan $Y = Y_B + 3 S_B$. Sedangkan LOQ menunjukkan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama dengan persamaan $Y_B + 10 S_B$.

Konsentrasi yang sudah ditentukan (2-12 μ g/mL) dimasukkan dalam persamaan kurva baku asiklovir $y = 52501.31x + 17476.13$. Berdasarkan perhitungan kurva baku, diperoleh nilai LOD asiklovir adalah 0,282 μ g/mL sedangkan nilai LOQ asiklovir adalah 0,635 μ g/mL (lampiran 3). Sedangkan penelitian sebelumnya yang dilakukan Ravisankar, et al, (2015) diperoleh nilai LOD 0,2470 μ g/mL dan LOQ 0,7486 μ g/mL. Nilai ini cukup memadai untuk analisis kualitatif asiklovir dengan menggunakan KCKT.

Metode penetapan kadar asiklovir dengan menggunakan KCKT yang dilakukan menunjukkan bahwa presisi, akurasi, selektivitas, sensitivitas dan linieritas memenuhi persyaratan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa validasi metode untuk penetapan kadar asiklovir telah tervalidasi maka dapat dipastikan metode yang dilakukan dapat digunakan untuk menetapkan kadar asiklovir.

Penetapan Kadar Asiklovir dalam Sediaan Salep

Penetapan kadar asiklovir dalam sediaan salep menggunakan KCKT dihitung dengan cara memplotkan luas area (Y) sampel dengan masing-masing kurva baku yang telah diperoleh yaitu $y = y = 52932.53x + 16615.47$

Hasil perhitungan kadar asiklovir dalam sediaan salep dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Kadar Asiklovir

Sam-pel	Luas Puncak	Kandungan asiklovir dalam 5 g sampel (mg)	Kadar %
1	554471	254.029	508.058
2	581799	266.936	533.872
3	558276	255.826	511.652
4	587696	269.721	539.442
5	554471	254.029	508.058
6	586034	268.936	537.872
Rata-rata		261.580	104.632
SD		1.539	3.079
RSD		0.029	2.943%

Kadar yang telah diperoleh memenuhi persyaratan yang tercantum dalam Farmakope Indonesia Edisi V (2014), yaitu asiklovir mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0%.

KESIMPULAN

Validasi metode penetapan kadar asiklovir menggunakan KCKT dengan fase diam C₁₈ dan fase gerak campuran asetonitril : asam fosfat dengan perbandingan 80:20 v/v dengan laju alir 1 mL/menit, panjang gelombang 254 nm dan volume injeksi 20 μ L dapat dilakukan.

Metode validasi di atas dapat memenuhi persyaratan validasi, yaitu memberikan hasil uji sebagai berikut : Uji presisi RSD 0,302 %, uji akurasi 99,603-101,800%, uji selektivitas menghasilkan luas puncak yang tajam, waktu retensi yang pendek, uji linieritas dengan (r) 0,9998 pada kisaran kosentrasi 2-12 μ g/mL, dengan LOD sebesar 0,282 μ g/mL dan LOQ sebesar 0,635 μ g/mL.

Metode yang sudah divalidasi tersebut dapat diaplikasikan pada penetapan kadar asiklovir dalam sediaan salep dengan hasil kadar rata-rata asiklovir pada sediaan salep adalah 104,632 %. Hal ini memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan Farmakope Indonesia Edisi V (2014).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, (2014), Farmakope Indonesia Edisi V. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anief, M., (2006), *Ilmu Meracik Obat*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Ansel, H.C., (1989), *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, Edisi 4, Universitas Indonesia UI-press, Jakarta.
- Ardiningsih, R., (2009), *Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Proses Analisis Deteksi Ion*, Penelitian Bidang Dirgantara, Pusterapan, LAPAN.
- Anonim, (2008), *Informatorium Obat Nasional Indonesia*, Badan Pengawasan Obat Dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.
- Bhavar B. G., Pekamwar S., S., Aheri B., K., Chaudhari R. S., (2014), *Development and Validation of RP-HPLC Method for the Determination of Valacyclovir Hydrochloride and its Related Substances in Tablet Formulation*, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 53-58.
- Food and Drug Administration & Centre for Drug Evaluation and Research, (2001), Guidance For Industry Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM070107.pdf>, diakses 11 Januari 2012.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., (2007), *Kimia Farmasi Analisis*, Cetakan II, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 246.
- Ghosh S., Sahu A., Kumar S., D., Jena S., harani A., Reddy K., P., T., Tanuja D., (2012), Method Development And Validation For Acyclovir In Tablet Dosage Form By RP-HPLC, India.
- Harmita, (2004), Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasiaan*, Vol.I, No. 3, 117-128.
- Miller, J.C., and Miller, J.N., (1998), *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 109-120.
- Muralidharan S., Kalaimani J., Parasuraman S., Dhanaraj A., S., (2014), Development and validation of Acyclovir HPLC External Standard Method in Human Plasma Application to Pharmacokinetic Studies, Hindiawi.
- Putra, E.D., (2007), *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi*, Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Ravisangkar P., Niharik A., Sireesha A., Khoushik S., O., Himaja G., (2015), Development And Validation Of RP-HPLC Method For Quantitative Estimation Of Acyclovir In Bulk Drug And Tablets, Hindiawi.
- Rohman, A., (2009), *Kromatografi Untuk Analisis Obat*, Ghara Ilmu, Yogyakarta.
- Sastrohamodjojo, H., (2002), *Kromatografi*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 67-77.
- Snyder, R.L., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., (1997), *Practical HPLC Method Development*, 2nd Edition, John Wiley & Son, Inc., New York, 686-697.