

Validasi Metode Analisis Dan Penetapan Kadar Asiklovir Menggunakan Pereaksi Ninhidrin Dan Asam Galat Dengan Spektrofotometri UV-Vis

Edtyva Monicha

¹Poltekkes Kemenkes Kupang

*) E-mail: edtyvam98@gmail.com

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Diterima

Disetujui

Dipublikasikan

Kata Kunci:

Asiklovir, Ninhidrin,
Asam Galat

Keywords:

Acyclovir, Ninhydrin,
Galat acid

Abstrak

Latar belakang: Asiklovir adalah obat antivirus yang aktif digunakan untuk mengobati infeksi HSV (*Herpes simplex virus*) tipe 1 dan virus tipe 2, obat ini juga berguna untuk pengobatan pada infeksi akibat varisela zoster virus. **Tujuan:** mencari metode alternatif untuk menganalisis asiklovir sehingga didapat hasil produk yang stabil, murah, efisien dan mudah diterapkan untuk menentukan kadar asiklovir dalam sediaan. **Metode:** penelitian di laboratorium meliputi panjang gelombang dan konsentrasi ninhidrin, serta dilakukan validasi metode analisis yang terdiri dari penentuan sensitivitas, linearitas, presisi, limit kuantifikasi, dan limit deteksi. **Hasil:** Terbentuknya kompleks hasil reaksi kondensasi/penggabungan antara Asiklovir dan Ninhidrin-Asam galat pada pH 5 berwarna ungu dengan serapan maksimum pada 543 nm diuji untuk mengevaluasi kandungan obat dalam formulasi secara kuantitatif. Kurva kalibrasi ditemukan linier hingga 30 µg/ml. **Simpulan dan saran:** metode analisis yang diusulkan telah terbukti sensitif dan reproduktif, sehingga cocok untuk penentuan asiklovir zat aktif maupun dalam bentuk sediaan farmasi.

Abstract

Background: Acyclovir is an antiviral drug that is actively used to treat HSV (*Herpes simplex virus*) type 1 and type 2 infections, this drug is also useful for the treatment of infections caused by varicella zoster virus. **Objective:** to find an alternative method to analyze acyclovir so that stable, cheap, efficient and easy-to-apply product results are obtained to determine the level of acyclovir in the preparation. **Method:** laboratory research includes wavelength and ninhydrin concentration, and validation of the analysis method is carried out consisting of determining sensitivity, linearity, precision, quantification limit, and detection limit. **Results:** The formation of a complex resulting from the condensation/combination reaction between Acyclovir and Ninhydrin-Gallic acid at pH 5 is purple with maximum absorption at 543 nm tested to evaluate the drug content in the formulation quantitatively. The calibration curve was found to be linear up to 30 µg/ml. **Conclusion and suggestion:** The proposed analytical method has been proven to be sensitive and reproducible, making it suitable for the determination of acyclovir as the active ingredient and in pharmaceutical dosage forms.

PENDAHULUAN

Asiklovir adalah obat antivirus yang aktif digunakan untuk mengobati infeksi HSV (*Herpes simplex virus*) tipe 1 dan tipe 2, obat ini juga berguna untuk pengobatan pada infeksi akibat varisela zoster virus. Asiklovir bekerja dengan cara menghambat DNA polymerase virus (Sweetman SC, 2009). Asiklovir tetap menjadi obat pilihan untuk profilaksis dan pengobatan infeksi HSV. Obat ini tersedia dalam berbagai bentuk seperti tablet, suspensi, injeksi intravena, dan salep mata (Sampson MR., dkk, 2014).

Penentuan kadar zat aktif merupakan persyaratan yang harus dipenuhi untuk menjamin kualitas sediaan obat. Salah satu persyaratan mutu adalah kadar yang dikandung harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam Farmakope Indonesia. Menurut Farmakope Indonesia edisi 5 persyaratan kadar asiklovir dalam tablet tidak kurang dari 98 % dan tidak lebih dari 101,0 % . Penetapan kadar dalam Farmakope Indonesia edisi V tahun 2014 menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), fase gerak yang digunakan asam asetat dan menggunakan asiklovir BPFI sebagai larutan baku, dimana kromatografi cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detector 254 nm (Depkes RI,2014).

Metode analisis KCKT memiliki beberapa kelebihan dan kekurangan, diantara kelebihan analisis KCKT adalah waktu analisis cepat, daya pisah yang baik, kepekaan tergantung pada jenis detector, cuplikan mudah diperoleh kembali, dapat digunakan untuk menganalisis molekul besar dan kecil, cuplikan mudah diperoleh kembali dan dapat digunakan untuk menganalisis sampel yang kadarnya rendah (Harmita,2014). Namun KCKT juga memiliki kekurangan antara lain biaya analisis yang relatif mahal dan membutuhkan keterampilan khusus dalam proses pengoperasiannya (Ganjar IG,2007). Untuk itu dicari metode alternatif yang membutuhkan waktu analisis yang singkat dengan biaya yang lebih rendah namun tetap memberikan ketepatan yang cukup tinggi. Metode analisis yang dapat digunakan adalah metode spektrofotometri uv-visible yang memiliki kelebihan lebih sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil, pelarut yang digunakan sedikit dan biaya analisis lebih murah (Vogel AI.,dkk,1994).

Pengembangan metode analisis untuk penetapan kadar obat perlu dilakukan, bertujuan untuk mencari metode alternatif dan perkembangan ilmu. Metode analisis yang dikembangkan harus memenuhi kriteria validasi metode analisis. Metode analisis yang dikembangkan tersebut harus memenuhi persyaratan validasi metode analisis. Ajima (2015) melakukan penetapan kadar asiklovir secara spektrofotometri uv-visible menggunakan pereaksi ninhidrin dan asam askorbat. Gugus fungsi pada asiklovir yang berperan dalam reaksi dengan ninhidrin adalah gugus amin primer. Ninhidrin berfungsi untuk menganalisis gugus amin secara spesifik. Sedangkan asam askorbat digunakan untuk membentuk senyawa hindrandantin yang akan membentuk warna. Asam askorbat berfungsi sebagai reduktor untuk mencegah senyawa hindrandantin yang mudah teroksidasi (Yokoyama,2003).

Pada penelitian ini akan digunakan asam galat sebagai reduktor sebagai pengganti asam askorbat dalam rangka pengembangan metode analisis. Metode analisis yang dikembangkan dalam penelitian ini merupakan metode analisis baru sehingga perlu dilakukan validasi metode analisis. Oleh sebab itu, dilakukan validasi metode analisis asiklovir dalam sediaan tablet secara spektrofotometri uv-visible menggunakan pereaksi ninhidrin dan asam galat sehingga di dapat hasil produk yang stabil, sensitif dan sederhana diterapkan untuk menentukan kadar asiklovir dalam sediaan tablet.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah Spektrofotometri UV-Visible (Shimadzu 1700 Pharmaspec), labu ukur, pipet gondok, mortir dan stamper, kuvet, spatel, timbangan analitik dan alat-alat kaca lainnya.

Bahan yang digunakan adalah Baku pembanding asiklovir BPFI (BPOM Jakarta), Pereaksi Ninhydrin (Milipore), Asam galat (Sigma-Aldrich), NaOH (Emsure), Asam sitrat (Emsure), Etanol (Emsure), Obat asiklovir sebanyak 20 tablet yang beredar dipasaran yaitu Asiklovir Kimia farma, Acifar®

Pengambilan sampel

Sampel merupakan salah satu obat antiherpes yaitu asiklovir. Asiklovir yang digunakan dalam bentuk sediaan tablet. Obat yang digunakan adalah obat generik berlogo (Asiklovir dari Kimia Farma) dan obat bermerek (Acifar®) yang dibeli di apotik yang beredar di pasaran.

Pembuatan larutan

Pembuatan NaOH 0,1 N

Ditimbang seksama 2 gram natrium hidroksida, kemudian masukan ke dalam erlenmeyer 500 mL, lalu ditambahkan aquadest dan dicukupkan hingga 500 mL.

Pembuatan Pereaksi Ninhydrin (1 % w/v)

Ditimbang seksama 1 gram ninhydrin dan larutkan dengan sedikit etanol didalam labu ukur 100 mL dan setelah itu volume larutan dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas.

Pembuatan larutan buffer (pH 5)

Ditimbang seksama 4,95 g asam sitrat dan 2 g NaOH yang dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian diatur hingga pH 5 dengan NaOH 0,1 N.

Pembuatan larutan asam galat (0,1% w/v)

Ditimbang 0,1 g asam galat dan larutkan menggunakan etanol 96% kedalam labu ukur 100 mL, volume dicukupkan sampai tanda batas.

Pembuatan Larutan Standar Asiklovir(1000 µg/mL)

Ditimbang 100 mg baku asiklovir, lalu masukkan dalam labu ukur 100 mL, kemudian dilarutkan dengan 50 mL NaOH 0,1 N, setelah itu kocok sampai larut dan volume dicukupkan sampai tanda batas dengan NaOH sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL.

Analisa Asiklovir

Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum (30 µg/mL)

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum asiklovir dengan pereaksi Ninhydrin dan asam galat menggunakan spektrofotometri UV-Visible dengan panjang gelombang 500-800 nm dengan konsentrasi 30 µg/mL dengan cara dipipet 0,3 mL larutan standar lalu dimasukan kedalam labu ukur 10 mL, lalu tambahkan 4 mL larutan buffer (pH 5), 1 mL larutan ninhydrin 1% b/v dan 0,5 mL b/v larutan asam galat 0,1 % dan dikocok selama 3 menit. Volume dicukupkan hingga 10 mL menggunakan aquades sehingga didapat konsentrasi 30 µg/mL. Dilakukan pengukuran panjang gelombang yang memberikan

serapan maksimum dan lakukanlah pengujian validasi metode analisis meliputi akurasi, presisi, linearitas, batas deteksi maupun batas kuantifikasi.

Validasi Metode

Linearitas

Larutan standar asiklovir dipipet sebanyak 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 dan 0,5 mL kedalam labu ukur 10 mL. lalu tambahkan 4 mL larutan buffer (pH 5), 1 mL larutan ninhydrin 1% b/v dan 0,5 ml b/v larutan asam galat 0,1 % dan dikocok selama 3 menit. Lalu dipanaskan dengan water bath pada suhu 60°C selama 15 menit. Kemudian didinginkan dalam air es dan volume dicukupkan hingga 10 mL menggunakan aquades sehingga didapat konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 $\mu\text{g/mL}$. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}).

Batas deteksi dan Batas kuantitasi

Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung dari persamaan linearitas larutan standar asiklovir. Dimana batas deteksi adalah konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang masih bias dideteksi dan batas kuantitasi adalah konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan kurasi.

Akurasi

Akurasi diperoleh dari menghitung perolehan kembali. Asiklovir dari larutan uji dengan penambahan bahan baku standar sebesar 80%, 100%, dan 120% dari konsentrasi larutan uji. Perolehan kembali memenuhi nilai akurasi jika % recovery berkisar 98%-102%.

Penentuan persentase perolehan kembali asiklovir, larutan standar asiklovir 1000 $\mu\text{g/mL}$ dipipet 0,1, 0,3, 0,5 mL secara berurutan ditambahkan pada larutan uji untuk perolehan kembali 80%, 100%, dan 120% dicukupkan volume sampai tanda batas dengan NaOH 0,1 N dalam labu ukur 100 mL. Kemudian larutan dipipet 0,1 mL lalu tambahkan 4 mL larutan buffer (pH 5), 1 mL larutan ninhydrin 1% b/v dan 0,5 ml b/v larutan asam galat 0,1 % dan dikocok selama 3 menit. Lalu dipanaskan dengan water bath pada suhu 60°C selama 15 menit. Kemudian didinginkan dalam air es dan volume dicukupkan hingga 10 mL menggunakan aquades sampai tanda batas. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}).

Presisi

Penentuan presisi intra-day dilakukan dengan memilih tiga konsentrasi larutan standar yaitu konsentrasi 10, 30, 50 $\mu\text{g/mL}$. larutan tersebut dianalisis pada tiga waktu yang berbeda dihari

yang sama dengan menggunakan spektrofotometri uv-visible. Sedangkan untuk menentukan presisi inter-day dilakukan dengan memilih tiga konsentrasi yang sama dengan presisi intra-day dan dianalisis selama tiga hari berturut-turut dengan menggunakan spektrofotometri uv-visible.

Penetapan Kadar Asiklovir

Pembuatan Larutan uji Asiklovir

Ditimbang 20 tablet asiklovir (mengandung 400 mg asiklovir per tablet). Lalu ditimbang serbuk yang setara dengan 100 mg asiklovir dari tablet yang telah digerus dipindahkan kedalam erlenmeyer 100 mL. kemudian ditambahkan 25 mL NaOH 0,1 N dan disonikasi selama 15 menit. Setelah itu disaring dengan kertas whatman no. 1. Filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan aquadest hingga tanda batas.

Penetapan kadar asiklovir pada larutan uji

Dipipet 1 ml larutan uji yang telah dibuat dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan tambahkan 4 mL larutan buffer (pH 5), 1 mL larutan ninhydrin 1% b/v dan 0,5 ml b/v larutan asam galat 0,1 % dan dikocok selama 3 menit. Lalu dipanaskan dengan water bath pada suhu 60°C selama 15 menit dan didinginkan dalam air es. Kemudian ditambahkan aquadest sampai 100 mL. Pengukuran absorban pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Setelah didapatkan serapan, hitung konsentrasi dengan menggunakan persamaan regresi yang didapatkan dari kurva kalibrasi. Setelah itu hitung kadarnya dengan menggunakan persamaan. Larutan blangko disiapkan dengan cara yang sama tanpa mengandung asiklovir.

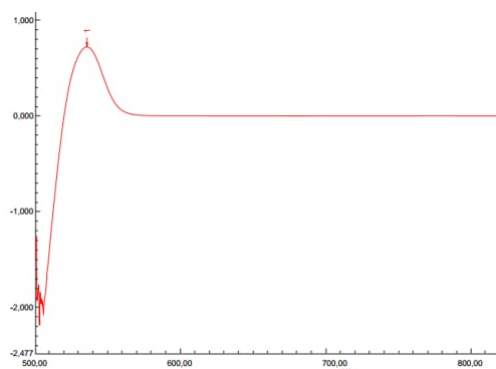
HASIL PENELITIAN

Pada hasil pengujian larutan asiklovir ditambahkan larutan buffer (pH 5), larutan ninhydrin 1% b/v dan b/v larutan asam galat 0,1 % dan dikocok selama 3 menit, volume dicukupkan hingga 10 mL sehingga terbentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Senyawa kompleks yang terbentuk diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang dari 500 sampai 800 nm. Pada penentuan ini dilakukan pengulangan pengukuran sebanyak tiga kali. Dalam proses pelarutan asiklovir digunakan aquades. Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan kelarutan asiklovir yang larut dalam air. Pengompleksan dilakukan pada pH 5, karena asiklovir stabil pada pH 4-5. asam galat, penggunaan asam galat sebagai antioksidan yang membentuk senyawa hindrandantin dimana senyawa ini yang akan membentuk warna ungu ruhermans.



Gambar 1. Larutan hasil reaksi asiklovir dan ninhidrin-asam galat.

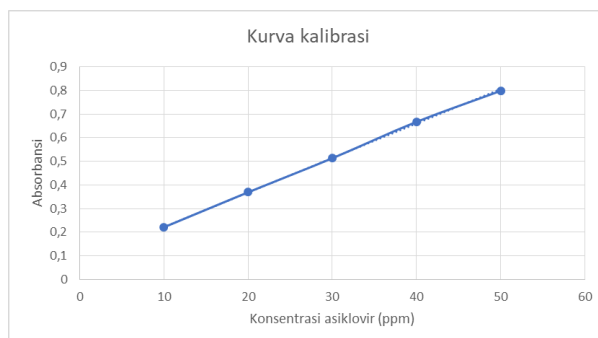
Dalam penentuan panjang gelombang serapan maksimum diukur absorbansi pada berbagai panjang gelombang, sehingga diperoleh absorbansi tertinggi, yang merupakan panjang gelombang yang paling optimal. Untuk itu, telah dilakukan pengukuran absorbansi pada berbagai panjang gelombang untuk mendeteksi panjang gelombang maksimum dan hasil pengukuran tersebut disajikan dalam Gambar 2.



Gambar 2. Panjang gelombang asiklovir.

Dari Gambar 2. dapat diketahui bahwa larutan dari senyawa hasil reaksi asiklovir dengan ninhidrin dan asam galat memberikan puncak serapan panjang gelombang yaitu 543 nm. Absorbansi warna ungu secara umum muncul di daerah panjang gelombang 500-800 nm (Ajima,2015).

Validasi terhadap metode juga telah dilakukan pada penelitian analisis asiklovir dengan metode spektrofotometri UV-Visibel serta menggunakan pereaksi ninhidrin dan asam galat. Validasi metode ini dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa prosedur analisis memberikan hasil analisis yang dapat diterima, sehingga prosedur analisis ini dapat diaplikasikan dan memberikan hasil yang akurat. Parameter yang divalidasi antara lain: sensitivitas, linearitas, presisi, limit kuantifikasi (LOQ) dan limit deteksi (LOD). Parameter analisis diperoleh dari hasil perhitungan secara statistik menggunakan Ms.Excel dari data kurva larutan standar yang ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva kalibrasi larutan uji asiklovir.

Tabel 1. Hasil pengujian validasi tablet asiklovir.

Parameter	Value
Akurasi	99,96±1,10
Slope (b)	0,0145
Intercep (a)	0,078
Range linearitas	10 : 50 ppm
Koefisien korelasi (r)	0,9995
LOD	0,3
LOQ	0,8
λmaks	543 nm

Pada pengujian tablet untuk tablet asiklovir Kimia farma dan tablet asiklovir bermerek acifar dibuat dalam larutan uji masing-masing 10 ppm didapat hasil % recovery berturut-turut untuk asiklovir kimia farma dengan pengujian tiga kali adalah 99.8 ± 1.16 , 98.9 ± 0.92 , 99.2 ± 1.63 sedangkan tablet asiklovir bermerek acifar adalah 97.1 ± 1.24 , 99.3 ± 1.43 , 99.1 ± 1.95 . untuk itu didapat range % recovery yang didapat berkisar 97-99 %. Terbentuknya kompleks ungu rumens berlangsung sampai reaksi selama 24 jam.

PEMBAHASAN

Asiklovir yang dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Visible dari hasil penelitian menghasilkan warna ungu menggunakan reaksi asiklovir dengan ninhidrin dan asam galat dapat sitrat dengan pH 5 (suasana asam) yang menyerap maksimal pada panjang gelombang 543 nm. hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Ajma akibat adanya gugus kromofor berupa cincin benzena terkonyugasi dan sampel yang dianalisis daerah sinar tampak harus menghasilkan warna ungu. Umumnya, analisis asiklovir yang dilaporkan menggunakan metode ini dikompleks dengan reagen kromogenik (ungu Ruhemann). Hal ini menunjukkan pergeseran batokromik pada λ_{maks} untuk obat tersebut,

Terbentuknya warna ungu berfungsi sebagai bukti reaksi antara asiklovir dan reagen kromogenik. Sebelumnya di jurnal dijelaskan bahwa untuk reaksi ninhidrin dengan amina primer, pH harus dipertahankan pada 5 untuk stabilitas optimum produk berwarna.

Stabilitas larutan yang terbentuk pada kondisi asam dengan penambahan agen pereduksi asam galat yang disebutkan di atas kemudian diuji selama 24 jam. Ditemukan bahwa warna tetap secara konstan pada suhu ruangan (25 ± 1 °C) dan nilai absorbansi produk yang terbentuk tetap tidak berubah setelah didiamkan selama 24 jam (gambar 1) pada suhu ruangan, yang menunjukkan stabilitasnya untuk periode waktu tersebut. Menurut Subbayamma, 2008, stabilitas reaksi yang terjadi harus dilakukan dengan penambahan agen pereduksi seperti asam galat maupun asam askorbat setelah 24 jam. Puncak pada 543 nm dipilih untuk pengukuran spektrofotometri karena lebih menonjol, menunjukkan intensitas serapan yang lebih tinggi. Selain itu, absorbtivitas molarnya juga tinggi dan sensitivitas terlihat dari akurasi dan koefisien korelasi yang diperoleh untuk persamaan regresi menunjukkan linearitas metode yang baik pengujian Serta metode yang diusulkan berhasil diterapkan untuk penentuan kuantitatif Asiklovir dalam dua formulasi tablet yang ada dipasaran.

SIMPULAN

Pembentukan senyawa kompleks ruhermans purple hasil reaksi antara ninhidrin dan asiklovir mempunyai panjang gelombang serapan maximum 543 nm. Metode analisis yang diusulkan telah terbukti sensitif, dan reproduktif, sehingga cocok untuk penentuan asiklovir zat aktif maupun dalam bentuk sediaan farmasi. Dengan demikian, metode ini dapat diadaptasi untuk pengendalian mutu Asiklovir di rumah sakit dan laboratorium di lingkungan yang kurang memadai di mana peralatan analitik yang lebih sederhana, biaya murah dan ketepatan yang cukup tinggi.

REFERENSI

- Ajima, U., & Onah, J. O. (2015). Spectrophotometric determination of acyclovir after its reaction with ninhydrin and ascorbic acid. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(4), 65–69. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50411>
- American Society of Hospital Pharmacists. (2011). *AHFS drug information*.
- Anantharaman, S., Padmarajaiah, N., Al-Tayar, N. G. S., & Shrestha, A. K. (2017). Ninhydrin–sodium molybdate chromogenic analytical probe for the assay of amino acids and proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.020>
- Bassett, J., Vogel, A. I., Pudjaatmaka, A., & Hadyana, S. L. (1944). *Buku ajar Vogel: Kimia analisis kuantitatif anorganik* (4th ed.). EGC.
- Cazes, J. (2005). *Analytical instrumentation handbook* (3rd ed.). Marcel Dekker.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2014). *Farmakope Indonesia* (Edisi V). Depkes RI.

Fox, B. J., & Norton, R. N. F. (1984). Ruhemann's purple from ninhydrin. *Bioorganic Chemistry*, 12, 235–241. [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(84\)90022-6](https://doi.org/10.1016/0045-2068(84)90022-6)

Ganjar, I. G., & Abdul, R. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Pustaka Pelajar.

Ganjar, I. G., & Abdul, R. (2012). *Analisis obat secara spektroskopi dan kromatografi*. Pustaka Pelajar.

Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2015). *Spektroskopi molekuler untuk analisis farmasi*. UGM Press.

Hansen, D. B., & Joullié, M. M. (2005). The development of novel ninhydrin analogues. *Chemical Society Reviews*, 34(5), 408–417. <https://doi.org/10.1039/B400567K>

Harvey, R. A., & Champe, P. C. (2013). *Farmakologi ulasan bergambar* (4th ed.). EGC.

Harmita. (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117–135.

Harmita. (2014). *Analisis fisikokimia: Kromatografi* (Vol. 2). EGC.

Hassan, H., Adam, S. K., Othman, F., Shamsuddin, A. F., & Basir, R. (2016). Antiviral nanodelivery systems: Current trends in acyclovir administration. *Journal of Nanomaterials*, 2016, Article 3128054. <https://doi.org/10.1155/2016/3128054>

Jain, D., Trivedi, V., Rathore, R. P. S., & Kamble, P. R. (2014). A review: Reagent in pharmaceutical analysis. *International Journal of Medical Chemistry and Analysis*.

Lopez, M., Martinez, F., Del Campo, V., Ferrit, M., & Rodriguez, L. (2003). Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. Elsevier.

Maesaroh, K., Kartini, D., & Anwar, J. (2017). Perbandingan metode uji aktivitas antioksidan DPPH, FRAP dan FIC terhadap asam askorbat, asam galat dan kuersetin. *Chimica et Natura Acta*, 5(3), 124–131. <https://doi.org/10.24198/cna.v5.n3.14660>

Pavia, D. L., Lampman, G. M., & Kriz, G. S. (2001). *Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry*. Thomson Learning.

Ramadhan, R. (2012). *Optimasi penambahan amonium sulfat pada penetapan kadar asiklovir dalam plasma in vitro secara kromatografi cair kinerja tinggi* (Skripsi).

Ravisankar, P., Sulthana, S., Babu, P. S., Basha, S. K. A., Aswini, R., & Swathi, V. (2017). Comprehensive review of important analytical reagents used in spectrophotometry. *International Journal of PharmTech Research*.

- Reolon, J. B., Brustolin, M., Haas, S. E., Bender, E. A., Malesuik, M. D., & Colomé, L. M. (2018). Development and validation of high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of acyclovir and curcumin in polymeric microparticles. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(1), 136–141. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8120>
- Sampson, M. R., Bloom, B. T., Lenfestey, R. W., Harper, B., Kashuba, A. D., & Anand, R. (2014). Population pharmacokinetics of intravenous acyclovir in preterm and term infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 33(1), 42–49. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000017>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of instrumental analysis* (6th ed.). Thomson Higher Education.
- Sohi, K. K., Mittal, N., Hundal, M. K., & Khanduja, K. L. (2003). Gallic acid exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 49, 221–227. <https://doi.org/10.3177/jnsv.49.221>
- Subbayamma, A. V., & Rambabu, C. (2008). Application of ninhydrin and ascorbic acid for the determination of cefpodoxime proxetil in pharmaceutical formulations. *Oriental Journal of Chemistry*.
- Sweetman, S. C. (2009). *Martindale: The complete drug reference* (36th ed.). Pharmaceutical Press.
- Yokoyama, S., & Hiramatsu, J. I. (2003). A modified ninhydrin reagent using ascorbic acid instead of potassium cyanide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(2), 204–205. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80028-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80028-3)
- Yusuf, F. (2016). Studi perbandingan obat generik dan obat dengan nama dagang. *Farmanesia*.