
**PENENTUAN KLORAMFENIKOL DALAM DAGING AYAM BROILER
DENGAN METODE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)**

Aman¹

¹Alumni Program Studi Budidaya Peternakan Universitas Brawijaya

Abstrak: *Determination of chloramphenicol on broiler meat in traditional market by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method has been done. The optimal of result determination to obtain, the HPLC system has been optimized for the important parameters are composition of mobile phase, injection sample volume, flow rate and eluent pH. The result of research shown that the optimum conditions to obtain from the research are composition of mobile phase methanol: water (80 : 20), injection sample volume 5 μ L, flow rate 0.5 mL/minute and eluent pH are 6 has been achieved. The analytical performance of method has been optimized and gives good performance which shown with reproducibility of this method as coefficient of variation percentage (% CV) was 0.2198 %, limit of detection was 0.1051 mg/L, and % recovery for the chicken meat sampel with 3 different samples > 95 %. This result showed this method capable to application for the routine analysis of the determination chloramphenicol content in samples.*

Kata Kunci: Chloramphenicol, HPLC, Analytical performance, Broiler Meat

PENDAHULUAN

Kebutuhan produk pangan asal hewan terus meningkat disebabkan oleh pertumbuhan penduduk, peningkatan pengetahuan, pergeseran gaya hidup dan tingkat kesejahteraan masyarakat semakin membaik. Kontribusi terbesar dalam penyediaan daging secara nasional umumnya berasal dari ternak unggas dan sapi potong. Produksi daging sejak tahun 2000 sampai dengan tahun 2005 rata-rata sekitar 21,29 % berasal dari ternak sapi potong dan 59,96 % berasal dari ternak unggas seperti ayam ras pedaging (Kartasudjana dan Suprijatna, 2006).

Ayam ras pedaging disebut juga *broiler*, merupakan jenis ras unggulan hasil persilangan dari jenis-jenis ayam yang memiliki daya produktivitas tinggi, terutama dalam memproduksi daging ayam. Ayam broiler ini sudah bisa dipanen pada usia 5-6 minggu. Dengan waktu pemeliharaan yang relatif singkat dan menguntungkan, maka banyak peternak baru serta peternak musiman yang bermunculan di berbagai wilayah Indonesia (AAK, 1986).

Untuk menghasilkan ayam broiler yang sehat dan memiliki daging yang besar, peternak sering menambahkan antibiotik ke dalam pakannya. Antibiotik dapat dipergunakan untuk pengobatan maupun sebagai pemacu pertumbuhan. Antibiotik yang banyak digunakan dalam pengobatan antara lain: fungistatika, penisilin, tetrasiklin, golongan makrolida dan kloramfenikol. Dalam UU No. 6 tahun 1967 Pemerintah menetapkan batas maksimum konsentrasi bahan pencemar fisik, kimia, biologis pada bahan baku pakan yang dapat mengganggu kesehatan dan produksi ternak serta konsumen produk ternak, tetapi pemerintah menetapkan larangan untuk setiap orang atau badan hukum agar tidak mencampur pakan dengan antibiotika tertentu sebagai *feed additive*.

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk menekan bahaya potensial yang diakibatkan residu pada manusia adalah dengan melakukan pemasakan jaringan hewan apabila hendak dikonsumsi. Hal ini akan menurunkan konsentrasi dari beberapa antibiotika seperti penisilin dan tetrasiklin. Beberapa antibiotika, seperti kloramfenikol dan streptomisin bersifat lebih stabil terhadap panas (Martaleni, 2007).

Metode uji resmi untuk residu antibiotik kloramfenikol yang umum digunakan di beberapa negara adalah metode kromatografi. Selain metode kromatografi juga digunakan metode *ELISA* (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) yang dapat digunakan sebagai metode alternatif, meskipun metode ini tidak

dianggap sebagai metode resmi atau metode konfirmatif. Kromatografi gas dan HPLC-MS mampu mendeteksi residu kloramfenikol atau residu nitrofurantoin dalam kadar yang sangat rendah, yaitu 0,1 ppb. Jenis alat lain yang lebih sederhana dan relatif lebih murah adalah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Alat ini juga dapat mendeteksi residu serendah metode LC/GC-MS (Islamulhayati dkk., 2005). Beberapa penelitian tentang zat antibiotika dalam ayam pedaging telah dilakukan, Suryani, D (2009) menentukan residu antibiotik tetrasiklin dalam ayam pedaging secara HPLC, menunjukkan kadar residu tetrasiklin dalam daging ayam pedaging berkisar 5 sampai 68 ppb. Martaleni (2009) menentukan bahwa pada daging dada, sayap, paha, hati, ginjal dan kaki (ceker) pada ayam pedaging yang berasal pasar tradisional di wilayah Kabupaten Tangerang tidak mengandung residu antibiotik. Hal ini dimungkinkan karena farmakokinetika obat pada fase farmakokinetika seperti, absorpsi, transpor, biotransformasi, distribusi dan ekskresi. Residu antibiotik dalam hati ayam di kota Yogyakarta untuk penisilin 29,23%, makrolid 36,92%, aminoglikosid 1,54 % dan tetrasiklin 26,15% (Oramahi, dkk, 2004).

Berdasarkan uraian diatas timbul keinginan untuk mengetahui konsentrasi kloramfenikol dalam ayam broiler. Konsentrasi kloramfenikol akan dianalisis menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Untuk mendapatkan hasil yang optimal telah dipelajari beberapa parameter pengukuran seperti: pengaruh komposisi fasa gerak (metanol:air), volume injeksi sampel, laju alir fasa gerak, dan pH fasa gerak, yang semua ini diharapkan dapat menghasilkan kinerja analitik yang baik untuk menentukan konsentrasi kloramfenikol dalam ayam broiler.

METODE

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Neraca analitik, blender, *grinder* sentrifugal *Vortex mixer*, *Vacuum rotary evaporator*, mikropipet, kertas pH universal, membran filter selulosa (0,45 μ m; 13 mm), HPLC Agilent 1100 series yang dilengkapi dengan kolom Si-C₁₈ dengan merk Waters (SEP-PAK) (i.d. 4,6 x 250 mm).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Daging ayam broiler, larutan standar kloramfenikol, buffer fosfat, metanol, aquabides IEW (*Ion Exchange Water*) asetonitril, n-heksana, natrium klorida, semuanya dengan kualitas pro analitik.

Optimasi Parameter Pengukuran HPLC

Optimasi parameter pengukuran HPLC yang dilakukan antara lain dengan cara memvariasikan komposisi fasa gerak (metanol : air) sebagai fasa gerak, laju alir fasa gerak, volume injeksi sampel, dan pH fasa gerak pada panjang gelombang 270 nm (Panggabean dkk., 2009).

Optimasi Kinerja Analitik

Linearitas Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan memvariasikan konsentrasi larutan standar 0; 0,5; 1; 2; 4; dan 6 ppm kemudian masing-masing di injeksikan sejumlah volume tertentu larutan standar ke dalam kolom menggunakan kondisi yang teroptimasi. Deteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 270 nm. Kromatogram yang diperoleh direkam dan dibuat kurva kalibrasi dari luas puncak, lalu dihitung persamaan regresi dan koefisien korelasi.

Presisi

Larutan standar kloramfenikol 0,5 ppm di injeksikan ke dalam kolom menggunakan kondisi yang teroptimasi, diulang sebanyak 7 kali, kemudian dicatat luas puncaknya dan dihitung koefisien variansinya.

Limit Deteksi

Limit deteksi dan limit kuantitatif ditentukan dengan membandingkan tinggi puncak zat dengan tinggi puncak derau. Tinggi puncak derau adalah tinggi puncak terbesar yang dihasilkan oleh garis dasar pelarut. Batas minimum limit deteksi adalah tinggi puncak zat 2 dan 3 kali lebih tinggi dari tinggi puncak derau, sedangkan batas minimum limit kuantitatif adalah tinggi puncak zat 10 kali lebih tinggi dari puncak derau (Panggabean dkk., 2010).

Penentuan Persentase Perolehan Kembali (% *Recovery*)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode *spike*. Pada tahap ini dipersiapkan larutan uji kloramfenikol 0,5 ppm. Dipipet 5 mL larutan standar tersebut lalu dimasukkan ke dalam labu 10 mL dan diencerkan dengan ekstrak dari daging ayam broiler sampai garis tanda. Larutan uji tersebut selanjutnya diinjeksikan ke injektor HPLC dan dihitung persentase perolehan kembalinya.

Penentuan Konsentrasi Kloramfenikol dalam Ayam Broiler

Preparasi Sampel (SNI 7541.1:2009)

Ditimbang \pm 5 gram sampel daging ayam broiler yang telah diblender kemudian dimasukkan ke dalam *vortex*. Ditambahkan 10 mL asetonitril dan dikocok selama 30 detik. Disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Dipisahkan supernatan dari larutannya. Untuk memperoleh hasil yang maksimal, perlakuan ini diulangi beberapa kali. Ditambahkan 1,5 gram NaCl ke dalam larutan dan dikocok selama 1 menit. Disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Dipisahkan supernatan dari larutannya. Ke dalam supernatan ditambahkan 5 mL n-heksana dan dikocok selama 30 detik. Didiamkan sampai terpisah sempurna hingga terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan n-heksana dibagian atas dan lapisan asetonitril dibagian bawah. Lapisan n-heksana dibuang dengan menggunakan pipet secara hati-hati. Lapisan asetonitril di *vacuum rotary evaporator* hingga hampir kering. Ekstrak yang diperoleh dilarutkan kembali dengan cara menambahkan 200 μ L campuran aquabides : metanol p.a dengan perbandingan 1:1 lalu disaring dengan membran filter selulosa. Filtrat ini siap untuk diinjeksikan ke injektor HPLC.

Penetapan Konsentrasi Kloramfenikol dalam Sampel

Sampel diinjeksikan ke dalam sistem HPLC melalui injektor. Direkam kromatogram dan dicatat luas puncak. Konsentrasinya dihitung dengan mensubstitusikan luas puncak kedalam persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

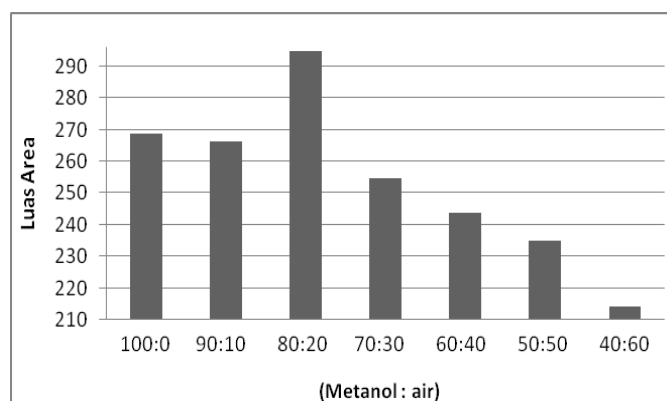
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Parameter HPLC

Kondisi kromatografi divariasikan untuk mendapatkan hasil analisis yang optimum. Kondisi kromatografi yang divariasikan adalah perbandingan fasa gerak metanol : air, laju alir eluen, dan pH eluen pada panjang gelombang 270 nm yang dilakukan secara bertahap. Penentuan hasil optimasi berdasarkan luas puncak kromatogram, karena luas puncak merupakan parameter yang lebih akurat untuk pengukuran kuantitatif (Ditjen POM, 1995).

Pengaruh Komposisi Fasa Gerak Metanol:air

Penelitian ini menggunakan kolom kromatografi cairan fasa terbalik (*reversed phase*), yaitu fasa gerak yang digunakan lebih polar bila dibandingkan dengan fasa diam yang bersifat nonpolar. Untuk penentuan kloramfenikol digunakan fasa gerak metanol dan air (IEW) karena kloramfenikol larut dalam metanol dan air. Fasa gerak selain berfungsi membawa komponen-komponen campuran menuju detektor, fasa gerak dapat berinteraksi dengan solut-solut (Hendayana, 2006).

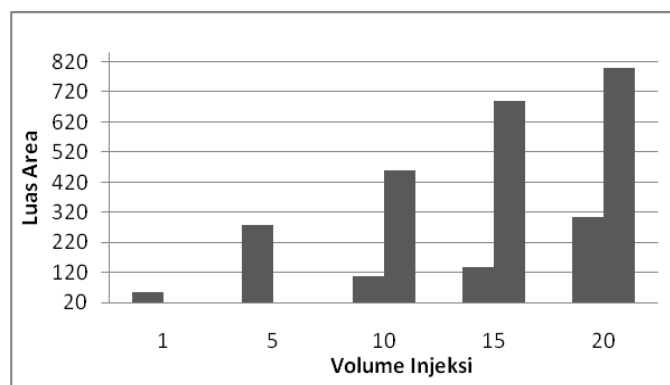


Gambar 1. Hasil Pengukuran Luas Area Kloramfenikol Pada Komposisi Fasa Gerak

Dari Gambar 1 dapat dilihat luas area paling besar didapatkan pada komposisi fasa gerak (metanol:air) pada perbandingan 80:20. Hal tersebut dapat terjadi karena pada komposisi fasa gerak metanol:air dengan perbandingan 80:20 memiliki tingkat kepolaran yang tepat untuk mengelusi kloramfenikol dari kolom yang bersifat non polar. Sebab semakin bertambahnya komposisi metanol didalam fasa gerak akan menurunkan kepolaran fasa gerak dan meningkatkan afinitas fasa gerak. Afinitas fasa gerak yang semakin meningkatkan menyebabkan elektron yang terdapat didalam fasa gerak akan semakin kuat interaksinya dengan sampel yang dalam penelitian ini adalah kloramfenikol, sehingga akan menaikkan kemampuan elusi fasa gerak tersebut (Rohman, 2009).

Pengaruh Volume Injeksi Sampel

Volume injeksi sampel sangat berpengaruh terhadap bentuk dan luas puncak yang dihasilkan. Dalam parameter ini digunakan berbagai variasi volume injeksi dengan komposisi fasa gerak yang optimum hasil pengukuran sebelumnya, yaitu metanol:air dengan perbandingan 80:20.

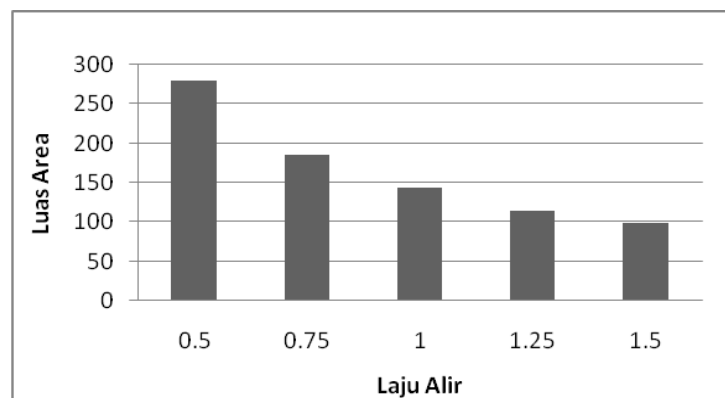


Gambar 2. Hasil Pengukuran Luas Area Kloramfenikol Terhadap Variasi Volume Injeksi

Dari Gambar 2. dapat dilihat bahwa pada volume injeksi sampel yang optimum adalah volume 5 μ L. Hal tersebut dikarenakan pada volume injeksi sampel lebih besar dari 5 μ L kromatogram yang terbentuk telah terbagi menjadi dua kromatogram. Hal tersebut dapat terjadi karena zona konsentrasi yang terbentuk ketika teretensi dalam kolom fasa diam non polar juga terbagi dua, diakibatkan jumlah analit cukup besar. Untuk langkah selanjutnya digunakan volume injeksi sampel adalah 5 μ L.

Pengaruh Laju Alir Fasa Gerak

Dalam parameter ini digunakan komposisi fasa gerak dan volume injeksi sampel yang optimum hasil pengukuran sebelumnya, yaitu metanol:air dengan perbandingan 80:20 dan volume injeksi sampel 5 μ L.



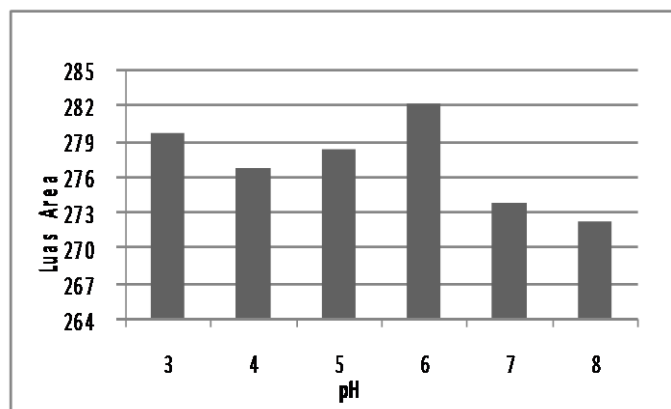
Gambar 3. Hasil Pengukuran Luas Area Kloramfenikol Terhadap Laju Alir Fasa Gerak

Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa pada laju alir fasa gerak 0,5 mL/menit menghasilkan kromatogram yang memiliki luas area yang paling besar dengan waktu retensi yang diperoleh, yaitu sekitar 6,2 menit. Dari gambar tersebut terlihat semakin kecil laju alir yang digunakan, maka luas area kromatogram yang terbentuk semakin besar. Hal tersebut dapat terjadi karena semakin besar laju alir yang digunakan, maka waktu interaksi antara kolom dengan sampel akan semakin singkat, sehingga sampel tidak terdeteksi oleh detektor secara maksimal.

Pada saat digunakan laju alir < 0,5 mL/menit, kromatogram yang dihasilkan memiliki luas area yang lebih besar, akan tetapi waktu retensi yang diperlukan semakin lama dan bentuk kromatogram yang tidak simetris, sehingga tidak dapat digunakan untuk analisis karena salah satu syarat penentuan yang baik adalah memiliki waktu retensi yang cepat dan hasil yang akurat.

Pengaruh pH Fasa Gerak

Pada tahap ini larutan standar kloramfenikol diinjeksikan pada kondisi yang optimum ke dalam injektor HPLC dengan memvariasikan pH fasa gerak antara 3-8. pH fasa gerak diatur dengan menambahkan larutan buffer fosfat.



Gambar 4. Hasil Pengukuran Luas Area Kloramfenikol Terhadap Ph Fasa Gerak

Pada Gambar 4 dapat dilihat perbedaan pH fasa gerak memberikan perubahan terhadap luas area kromatogram pada konsentrasi larutan standar kloramfenikol yang sama. Luas area kromatogram yang paling besar dihasilkan pada fasa gerak pH 6, sehingga dapat disimpulkan pH 6 adalah pH optimum untuk analisa kloramfenikol. Data ini didukung bahwa kloramfenikol memiliki stabilitas maksimumnya dicapai pada pH 6 (Sunan, 2006).

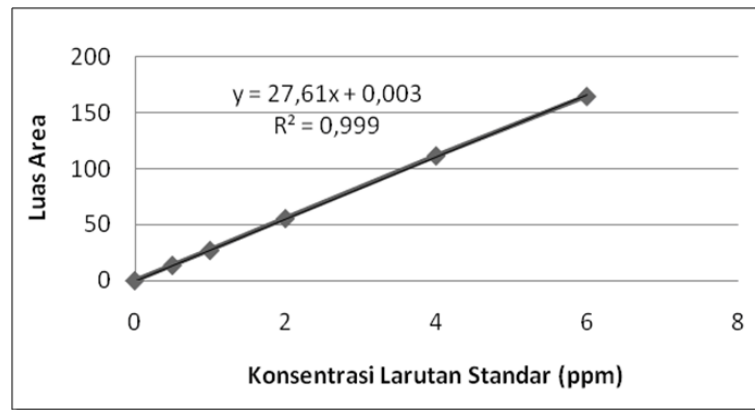
Kinerja Analitik

Setelah optimasi parameter HPLC dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan optimasi kinerja analitik yang terdiri dari kurva kalibrasi (linieritas), uji presisi (kebolehlulangan) dengan parameter koefisien variansi (% KV), batas deteksi (LOD) dan persentase perolehan kembali (% recovery).

Penentuan Kurva Kalibrasi (Linieritas)

Penentuan linieritas kurva kalibrasi kloramfenikol dilakukan pada kondisi optimum yang diperoleh pada optimasi parameter HPLC. Kurva kalibrasi ditentukan berdasarkan luas area kromatogram pada konsentrasi larutan standar kloramfenikol dan masing-masing disuntikkan sebanyak 5 µl.

Dari Gambar 5 terlihat bahwa koefisien korelasi (r) sebesar 0,999 dan persamaan garis regresi $Y = 27,61 X + 0,003$. Nilai tersebut sesuai dengan syarat laboratorium secara umum, dengan nilai koefisien sebesar 0,90-0,990; dan nilai koefisien korelasi ideal (r)=1. Nilai koefisien korelasi menurut tabel Pearson dengan n=6 ialah 0,917. Maka, nilai ini telah memenuhi syarat digunakannya kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi larutan standar dan luas area kromatogram untuk pengukuran analisis rutin.

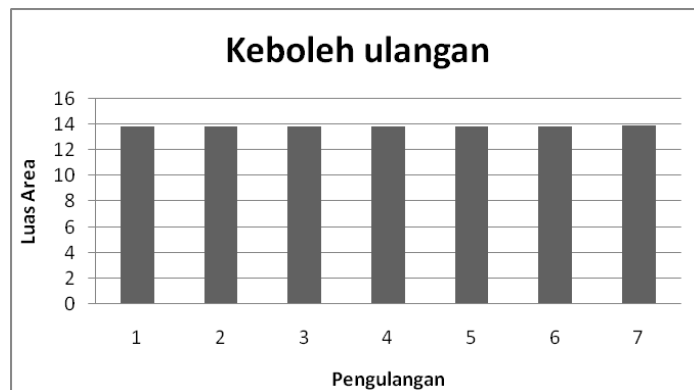


Gambar 5. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kloramfenikol

Kebolehlugan (Presisi)

Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian/kedekatan hasil antara hasil uji analisis yang dianalisis dengan cara yang sama. Pada percobaan ini, presisi ditetapkan berdasarkan keterulangan luas area kromatogram hasil analisa dengan tujuh kali pengulangan pada larutan standar. Perbedaan absolut dari data hasil analisa diharapkan berada dalam kisaran nilai kepercayaan 95 % atau nilai relatif standar deviasi lebih kecil dari 5 % (LIPI, 2003).

Tingkat kebolehlugan atau nilai presisi pada penelitian ini diukur luas area kromatogram larutan standar kloramfenikol 0,5 ppm yang dilakukan sebanyak 7 kali pengulangan dengan larutan standar kloramfeikol dibuat dalam kondisi dan komposisi yang tetap.



Gambar 6. Hasil Pengukuran Kebolehlugan Standar Kloramfenikol 0,5 ppm

Kebolehlugan ditunjukkan dengan % KV (koefisien variansi). Hasil pengukuran ditunjukkan pada Gambar 6. Dari hasil penelitian yang diperoleh, % KV untuk penentuan kloramfenikol 0,5 ppm adalah 0,2197 %. Untuk mengetahui apakah % KV yang didapatkan baik atau tidak, maka dibandingkan dengan nilai Horwitz. Nilai Horwitz untuk data ini adalah 2,6939 %. Jika dibandingkan % KV hitung < % KV persamaan Horwitz. Hal ini menggambarkan bahwa metode yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai akurasi presisi yang baik.

Limit Deteksi (Limit of Detection)

Ketidakpastian terhadap analisis akibat pengukuran contoh uji yang sangat rendah, dapat teratasi dengan menentukan limit deteksi. Limit deteksi berguna dalam memastikan suatu respon yang ditimbulkan suatu analisis (LIPI, 2003). Penentuan limit deteksi pada percobaan ini berdasarkan pada pengukuran larutan standar sebanyak 5 kali dan ditentukan simpangan baku dari data yang ada sehingga dapat diketahui nilai deteksi dengan rumus yang ada. Dari hasil penelitian yang dilakukan untuk penentuan kloramfenikol dengan metode HPLC diperoleh batas deteksi kloramfenikol sebesar 0,1051 ppm.

Persentase Perolehan kembali (% *Recovery*)

Salah satu syarat metode analisis yang baik adalah memiliki ketelitian atau akurasi yang tinggi. Parameter uji yang digunakan untuk menilai ukuran akurasi pada penelitian ini adalah parameter persentase perolehan kembali (% *recovery*) (LIPI, 2003). Pada penelitian ini, pengukuran persentase perolehan kembali (% *recovery*) dengan metode *spike* bertujuan untuk melihat pengaruh matriks berupa daging ayam pada pengukuran konsentrasi kloramfenikol. Hasil persentase perolehan kembali (% *recovery*) yang dihasilkan untuk penentuan kloramfenikol dalam daging ayam broiler untuk 3 sampel berbeda, antara lain sampel 1 sebesar 109,4194 %, pada sampel 2 sebesar 89,6863 %, dan pada sampel 3 sebesar 105,116 %. Hal ini menunjukkan bahwa akurasi metode ini cukup baik untuk digunakan untuk analisa kloramfenikol dalam daging ayam.

Penentuan Konsentrasi Kloramfenikol dalam Daging Ayam Broiler

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi kloramfenikol dalam daging ayam broiler dengan menggunakan HPLC yang sebelumnya telah dioptimasi dan dilanjutkan dengan optimasi kinerja analitik sehingga diperoleh kondisi yang optimal untuk analisis. Berdasarkan data hasil optimasi yang telah dilakukan, selanjutnya ditentukan konsentrasi kloramfenikol dari dalam daging ayam broiler.

Dari pensubstitusian luas area kromatogram tiap sampel ke dalam persamaan kurva kalibrasi, dapat ditentukan konsentrasi kloramfenikol dalam daging ayam broiler seperti dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1: Konsentrasi Kloramfenikol dalam Ayam Broiler

No.	Sampel	Konsentrasi Kloramfenikol ($\mu\text{g/g}$)
1.	Daging ayam broiler 1	$4,2916 \times 10^{-3}$
2.	Daging ayam broiler 2	$3,4452 \times 10^{-3}$
3.	Daging ayam broiler 3	$6,7960 \times 10^{-3}$

KESIMPULAN

1. Penentuan konsentrasi kloramfenikol dalam daging ayam boiler dapat dilakukan dengan menggunakan teknik HPLC menggunakan kolom Si-C₁₈ pada kondisi optimum yang diperoleh.
2. Kinerja analitik penentuan kloramfenikol dengan teknik HPLC sangat baik ditunjukkan dengan paramter pengukuran seperti: kebolehlungan ditunjukkan dengan % KV sebesar 0,2198 %, limit deteksi (LOD) adalah 0,1051 mg/L, serta persentase perolehan kembali > 95 %, menunjukkan keefektifan dan kesensitifan metode yang digunakan sehingga layak digunakan untuk analisis rutin penentuan kloramfenikol dalam berbagai sampel.

Daftar Pustaka

- A A K. 1998. *Beternak Ayam Pedaging*. Yogyakarta: Kanisius.
- BSN. 2009. *SNI 7541.1:2009 (Metode pengujian dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)-Bagian 1 : Residu kloramfenikol dalam daging, telur, susu, dan olahannya)*.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan*. Bandung: ROSDA.
- Islamulhayati, Keman,S, Yudhastuti.R. 2005. *Pengaruh Residu Kloramfenikol dalam Udang Windu terhadap Kejadian Anemia Aplastik pada Mencit*. Jurnal Kesehatan Lingkungan Vol. 1 No. 2. Universitas Airlangga.
- Kartasudjana R dan Suprijatna E. 2006. *Manajemen Ternak Unggas*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Martaleni. 2007. *Deteksi residu Antibiotik pada Karkas, Organ, dan Kaki Ayam Pedaging yang Diperoleh dari Pasar Tradisional Kabupaten Tangerang*. Thesis. Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Oramahi, R, Yudhabuntara.D, Budiharta.S. 2004. *Kajian Residu Antibioik pada Hati Ayam di Kota Yogyakarta*. Program Studi Sain Veteriner. Pascasarjana. Universitas Gadjah Mada.

- Panggabean, A. S., Amran, M.B., Buchari and Achmad, S. 2009. *Speciation of Organotin Compounds with Ion pair-reversed phase Chromatography technique*. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 4(2). pp 215-225.
- Panggabean, A. S., Amran, M.B., Buchari and Pasaribu, S.P. 2010. *Integrated Gas-Liquid Separator-Reactor for Determination Sn(II) at Trace Levels in Solution*. Yogyakarta: Indo. J. Chem. pp. 51-57.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Suryani, D. 2009. *Validasi Metode Analisis Residu Antibiotik Tetrasiklin dalam Daging Ayam Pedaging secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Sunan, I.K.S. 2006. *Pengaruh Cara Sterilisasi Terhadap Penguraian Kloramfenikol dalam Sediaan Tetes Mata dengan Metode Uji Dipercepat*. Laporan Penelitian Sarjana Bidang Farmasi. Universitas Padjadjaran

Corresponding authors email address: tokometro103@gmail.com