

Formulasi dan Penentuan *Stress Testing* Sediaan Krim M/A dan A/M Ekstrak Etanol Edamame (*Glycine max*) (*Formulation and Stress Testing of Ethanol Extract Edamame (Glycine max) O/W and W/O Cream*)

Oktavia Catur Xenograf, Budipratiwi Wisudyaningsih, Siti Muslichah, Mochammad Amrun Hidayat

Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: oktaviacxenograf@gmail.com

Abstract

Edamame is a species of soybean (*Glycine max*) that contains isoflavone which has tyrosinase inhibitory activity. The aims of this study were to determine the effect of formulation on genistein content and the effect of storage temperature (25 °C and 50 °C) on oil in water (o/w) and water in oil (w/o) cream physicochemical characteristics (viscosity, spreadability, and pH). Genistein level was determined using thin layer chromatography (TLC) densitometry method and stability test was determined using stress testing method. The result showed that formulation gave no effect on genistein content in o/w and w/o cream with recovery values of 95.4178 ± 2.2815 % and 101.8276 ± 5.0063 %, respectively. The storage at 25 °C gave no effect on physicochemical characteristic, while the storage at 50 °C decreased viscosity value and increased spreadability value of cream.

Keywords: edamame, isoflavone, cream, stress testing

Abstrak

Edamame merupakan spesies kedelai (*Glycine max*) yang mengandung senyawa isoflavon sebagai penghambat enzim tirosinase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh formulasi terhadap kadar genistein dan pengaruh suhu penyimpanan (25 °C dan 50 °C) terhadap karakteristik fisika dan kimia (viskositas, daya sebar, dan pH) sediaan krim minyak dalam air (m/a) dan air dalam minyak (a/m). Penetapan kadar genistein dalam sediaan krim menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) densitometri dan pengujian stabilitas sediaan krim menggunakan metode *stress testing*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa formulasi tidak mempengaruhi kadar genistein dalam sediaan krim m/a dan a/m dengan perolehan kembali kadar genistein berturut-turut sebesar $95,4178 \pm 2,2815$ % dan $101,8276 \pm 5,0063$ %. Penyimpanan pada suhu 25 °C tidak mempengaruhi karakteristik fisika kimia, sedangkan penyimpanan pada suhu 50 °C mengakibatkan penurunan nilai viskositas dan peningkatan nilai daya sebar kedua krim.

Kata kunci: edamame, isoflavon, krim, stress testing

Pendahuluan

Kosmetik adalah bahan atau sediaan yang digunakan pada bagian luar tubuh manusia untuk membersihkan, menambah daya tarik, dan memelihara tubuh [1]. Salah satu produk kosmetika yang berkembang pesat yaitu krim pemutih. Bahan pemutih kulit seperti hidrokuinon, merkuri, dan asam retinoat telah banyak digunakan sebagai zat aktif dalam kosmetika pemutih kulit, namun zat-zat tersebut diketahui memberikan efek samping yang tidak diinginkan seperti iritasi pada kulit [2]. Oleh karena itu, saat ini telah dikembangkan bahan pemutih kulit dari bahan

alam yang relatif lebih aman. Penghambatan enzim tirosinase merupakan salah satu cara untuk mencapai efek pemutih kulit. Enzim tirosinase ini memiliki peran utama dalam mengkatalisis hidroksilasi L-Tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi L-dopakuinon yang selanjutnya akan diubah menjadi melanin [3].

Salah satu senyawa yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase adalah isoflavon [4]. Isoflavon merupakan kandungan utama dalam edamame [5]. Salah satu senyawa isoflavon yang memiliki aktivitas hambatan tirosinase adalah genistein. Genistein

merupakan merupakan isoflavon aglikon terbesar yang terdapat didalam kedelai [6]. Edamame merupakan varietas kedelai (*Glycine max*) yang dipanen saat bijinya masih muda [7]. Kandungan genistein dalam edamame sebesar 0,0252 % b/b dan nilai IC₅₀ ekstrak etanol edamame terhadap enzim tirosinase sebesar 92,795 µg/mL [8].

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, maka dilakukan pengembangan formulasi sediaan krim dengan bahan aktif ekstrak etanol edamame. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh formulasi terhadap kadar gensitein dalam sediaan krim. Pada penelitian ini dirancang 2 formula krim yaitu formula F1 dengan tipe krim minyak dalam air (m/a) dan formula F2 dengan tipe krim air dalam minyak (a/m) [9].

Selain itu juga dilakukan uji *stress testing* untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap stabilitas fisika kimia sediaan krim ekstrak etanol edamame. Pengujian *stress testing* dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu 50 °C dan 25 °C sebagai kontrol (kondisi tanpa *stress testing*) [10].

Metode Penelitian

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah densitometer (CAMAG TLC 3), *waterbath* (Mettler), *sentrifuge* (Hermle), viskotester (Rion VT 04), alat penguji daya sebar, pH meter (Denver), timbangan analitik digital (Ohaus), oven (Mettler), dan alat-alat gelas (Pyrex).

Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol edamame, standar genistein (Tocris), lempeng KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ (Merck), metanol p.a. (Smart Lab Indonesia), toluen (Smart Lab Indonesia), etil asetat (Smart Lab Indonesia), aseton (Smart Lab Indonesia), asam format (Smart Lab Indonesia), vaselin (Brataco Chemika), asam stearat (Brataco Chemika), metil paraben (Brataco Chemika), propilen glikol (Brataco Chemika), propil paraben (Brataco Chemika), polisorbate 80 (Brataco Chemika), trietanolamin, sorbitan 80, lanolin hidrat, setil alkohol, stearil alkohol, gliserin, oleum rosae, dan akuades.

Prosedur penelitian

Formulasi ekstrak etanol edamame

Formula yang digunakan dalam penelitian merujuk dari penelitian sebelumnya, namun telah dilakukan beberapa perubahan pada komponen dan komposisi bahan [11,12]. Hal tersebut dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan sediaan krim yang memenuhi

karakteristik fisika kimia yang diharapkan. Rancangan formula krim ekstrak etanol edamame dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2. Pembuatan sediaan krim dilakukan dengan metode peleburan pada suhu 70 °C.

Tabel 1. Formula F1 krim ekstrak etanol edamame tipe m/a

Nama Bahan	Fungsi	Komposisi (% b/b)
Ekstrak	Bahan aktif	1,5*
Propilen glikol	<i>Humectant</i>	10
Polisorbat 80	<i>Emulsifying agent</i>	3
Trietanolamin	<i>Emulsifying agent</i>	0,5
Metil Paraben	Pengawet	0,1
Oleum rosae	<i>Corigen odoris</i>	0,2
Akuades	Pelarut	70,15
Asam stearat	<i>Emulsifying agent</i>	8
Setil alkohol	<i>Stiffening agent</i>	4
Lanolin hidrat	<i>Emollient</i>	2
Simetikon	<i>Anti foaming</i>	0,5
Propil Paraben	Pengawet	0,05

Keterangan: *, dosis bahan aktif yang digunakan dalam formula berdasarkan nilai IC₅₀ ekstrak etanol edamame.

Tabel 2. Formula F2 krim ekstrak etanol edamame tipe a/m

Nama Bahan	Fungsi	Komposisi (% b/b)
Ekstrak	Bahan aktif	1,5*
Propilen glikol	<i>Humectant</i>	10
Polisorbat 80	<i>Emulsifying agent</i>	1,5
Metil Paraben	Pengawet	0,1
Oleum rosae	<i>Corigen odoris</i>	0,2
Akuades	Pelarut	31,31
Vaselin	<i>Emollient</i>	25
Lanolin hidrat	<i>Emollient</i>	15
Setil alkohol	<i>Stiffening agent</i>	2
Asam stearat	<i>Thickening agent</i>	10
Sorbitan 80	<i>Emulsifying agent</i>	2,84
Simetikon	<i>Anti foaming</i>	0,5
Propil Paraben	Pengawet	0,05

Keterangan: *, dosis bahan aktif yang digunakan dalam formula berdasarkan nilai IC₅₀ ekstrak etanol edamame.

Penetapan kadar genistein dalam sediaan

Penetapan kadar genistein dalam sediaan krim ekstrak etanol edamame dilakukan menggunakan metode KLT densitometri.

Preparasi larutan standar dan sampel

Preparasi larutan standar genistein dilakukan dengan membuat larutan induk 500 µg/mL (dalam metanol p.a) kemudian diencerkan sehingga diperoleh seri konsentrasi standar dengan rentang 4 - 40 µg/mL. 5,5 g sediaan dilarutkan dalam metanol p.a ad 10 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 300 rpm selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dan dianalisis.

Penentuan panjang gelombang maksimum

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* noda analit pada area panjang gelombang 200 - 400 nm. Penilaian

panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan pada panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum paling tinggi.

Pengujian presisi

Pengujian presisi yang dilakukan yaitu kategori repeatabilitas. Pengujian presisi repeatabilitas dilakukan dengan menganalisis sampel (6x replikasi) pada hari yang sama.

Pengujian akurasi

Pengujian akurasi dilakukan dengan melihat perolehan kembali genistein dengan menambah standar 30 % (3x replikasi) dari konsentrasi genistein dalam sediaan krim.

Penetapan kadar genistein dalam sediaan

Larutan standar genistein ditotolkan sebanyak 2 µL dan masing-masing sampel sebanyak 6 µL pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄. Lempeng dieluasi menggunakan eluen toluen :etil asetat : aseton : asam format (20:4:2:1) [13]. Noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm selanjutnya dilakukan *scanning* dengan TLC scanner pada panjang gelombang maksimum genistein hasil optimasi.

Evaluasi sediaan

Pengujian viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viscotester VT-04. Spindel dicelupkan ke dalam krim yang akan diuji viskositasnya hingga terbenam seluruhnya. Nilai viskositas yang diharapkan sebesar 50 - 200 dPa.s [14].

Pengujian daya sebar

Pengujian daya sebar krim dilakukan menggunakan alat penguji daya sebar yang terdiri dari dua lempeng kaca bulat. Pada lempeng bawah terdapat skala pengukur diameter. Sebanyak 1 gram krim diletakkan di pusat antara dua lempeng kaca bulat, diberi beban seberat 5 gram, dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya beban ditambah dengan interval 5 gram hingga diameter krim menunjukkan nilai yang konstan. Diameter sediaan krim yang diinginkan sebesar 5 – 7 cm [15].

Pengujian pH

Pengujian pH sediaan krim dilakukan dengan menggunakan pH meter digital. Sebanyak 1 gram krim dimasukkan dalam gelas beker kemudian ditambahkan aquadest sampai 10 mL. Elektroda dimasukkan hingga kedalaman 0,5 cm ke dalam larutan sampel dan dicatat pH yang terukur. PH sediaan krim yang diharapkan sebesar 5 – 7 [16].

Pengujian *stress testing*

Sediaan krim F1 dan F2 dimasukkan dalam pot gelas dan disimpan pada suhu 25 °C dan suhu 50 °C selama 30 hari. Sediaan krim kemudian dievaluasi karakteristik fisika kimia (viskositas, daya sebar, dan pH) dengan prosedur yang sama pada saat pengujian karakteristik fisika kimia sediaan krim sebelum penyimpanan. Hasil pengujian karakteristik fisika kimia setelah penyimpanan kemudian dibandingkan dengan hasil pengujian sebelum penyimpanan.

Analisis data

Data perolehan kembali (*recovery*) kadar genistein dianalisis menggunakan uji t tidak berpasangan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna perolehan kembali kadar genistein pada masing-masing sediaan krim dengan tingkat kepercayaan 95 %. Analisis statistik yang kedua dilakukan untuk mengetahui perbedaan bermakna nilai viskositas, daya sebar, dan pH sebelum penyimpanan, setelah penyimpanan suhu 25 °C, dan setelah penyimpanan suhu 50 °C dengan menggunakan uji *repeated* ANOVA. Uji dilanjutkan dengan uji LSD (*least significant difference*) jika diperoleh hasil yang berbeda signifikan [17].

Hasil Penelitian

Penetapan kadar genistein dalam sediaan

Hasil penentuan panjang gelombang diperoleh panjang gelombang maksimum genistein yaitu 266 nm. Hasil uji presisi diperoleh kadar genistein rata-rata dalam sediaan krim sebesar 0,0003607 % b/b dan nilai RSD sebesar 0,73 %. Hasil uji akurasi diperoleh nilai perolehan kembali kadar genistein sebesar 97,7291 %. Hasil penetapan kadar genistein dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar genistein

Formula	Recovery (%)
F1	95,4178 ± 2,28 ^a
F2	101,8276 ± 5,01 ^a

Keterangan: Data disajikan dalam rata-rata ± RSD (n=3), notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel (uji t tidak berpasangan, p<0,05).

Pengujian *stress testing*

Hasil evaluasi karakteristik fisika kimia sediaan (viskositas, daya sebar, dan pH) sebelum dan sesudah pengujian *stress testing* dapat dilihat pada Tabel 4, 5, dan 6.

Tabel 4. Hasil pengujian viskositas krim F1 dan F2

Formula	Viskositas sebelum (dPa.s)	Viskositas setelah suhu 25 °C (dPa.s)	Viskositas setelah suhu 50 °C (dPa.s)
F1	127,33 ± 2,08 ^a	128,00 ± 2,65 ^a	92,33 ± 2,52 ^b
F2	181,00 ± 2,65 ^a	182,00 ± 3,61 ^a	117,67 ± 2,52 ^b

Keterangan: Data disajikan sebagai rata-rata ± SD (n=3), notasi huruf yang berbeda dalam satu baris menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel (uji LSD, p<0,05).

Tabel 5. Hasil pengujian daya sebar krim F1 dan F2

Formula	Daya sebar sebelum (cm)	Daya sebar setelah suhu 25 °C (cm)	Daya sebar setelah suhu 50 °C (cm)
F1	6,77 ± 0,15 ^a	6,83 ± 0,21 ^a	8,00 ± 0,01 ^b
F2	6,10 ± 0,26 ^a	6,13 ± 0,21 ^a	6,90 ± 0,10 ^b

Keterangan: Data disajikan sebagai rata-rata ± SD (n=3), notasi huruf yang berbeda dalam satu baris menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel (uji LSD, p<0,05).

Tabel 6. Hasil pengujian pH krim F1 dan F2

Formula	pH sebelum	pH setelah 25 °C	pH setelah 50 °C
F1	6,77 ± 0,07 ^a	6,74 ± 0,10 ^a	6,58 ± 0,21 ^a
F2	5,84 ± 0,06 ^a	5,82 ± 0,06 ^a	5,67 ± 0,07 ^a

Keterangan: Data disajikan sebagai rata-rata ± SD (n=3), notasi huruf yang berbeda dalam satu baris menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel (uji repeated ANOVA, p<0,05).

Pembahasan

Penetapan kadar genistein dalam sediaan

Pada hasil uji presisi diperoleh kadar genistein rata-rata dalam sediaan krim sebesar 0,0003607 % b/b. Kriteria penerimaan RSD untuk konsentrasi analit 0,0003607 % b/b adalah tidak melebihi 11 % [18]. Pada uji presisi diperoleh nilai RSD sebesar 0,7295 % dan nilai ini memenuhi persyaratan RSD yang ditetapkan. Kriteria penerimaan perolehan kembali kadar genistein untuk konsentrasi analit 0,0003607 % b/b harus berada pada rentang 80 % - 110 % [18]. Pada hasil uji akurasi didapatkan perolehan kembali kadar genistein rata-rata dalam sediaan krim sebesar 97,7291 % dan nilai ini berada pada rentang perolehan kembali yang dipersyaratkan. Berdasarkan penilaian parameter presisi dan akurasi yang telah

dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan bersifat presis dan akurat.

Hasil penetapan kadar yang didapatkan menunjukkan bahwa kadar genistein dalam sediaan krim yang dibuat seragam. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai RSD pada replikasi pembuatan memenuhi RSD yang dipersyaratkan yaitu tidak melebihi 11 % [18]. Berdasarkan hasil penetapan kadar diperoleh perolehan kembali kadar genistein rata-rata dalam F1 dan F2 berturut-turut sebesar 95,4178 % dan 101,8276 %. Nilai tersebut berada pada rentang perolehan kembali yang telah dipersyaratkan yaitu 80 % - 110 % [18].

Pengujian stress testing

Evaluasi karakteristik fisika kimia sediaan krim ekstrak etanol edamame dilakukan dengan tujuan mendapatkan sediaan krim yang memenuhi karakteristik fisika kimia sesuai dengan spesifikasi yang telah ditentukan. Pengujian karakteristik fisika kimia ini meliputi viskositas, daya sebar, dan pengukuran pH. Setelah dilakukan evaluasi sediaan, selanjutnya dilakukan uji *stress testing* untuk mengetahui stabilitas awal sediaan krim ekstrak etanol edamame.

Pada hasil pengujian nilai viskositas diketahui bahwa semua formula memenuhi nilai viskositas yang diinginkan, yaitu 50 - 200 dPa.s [14]. Nilai viskositas sesudah penyimpanan suhu 50 °C mengalami penurunan, baik pada F1 maupun F2. Penurunan viskositas terjadi karena adanya panas berlebih terhadap krim, sehingga menyebabkan peleburan pada beberapa bahan penyusun krim. Bahan yang dimungkinkan mengalami peleburan adalah lanolin hidrat dan setil alkohol, karena bahan-bahan tersebut memiliki titik lebur pada rentang suhu 45 - 55 °C [19]. Pernyataan tersebut didukung oleh hasil uji statistik yang menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu 50 °C memberikan pengaruh terhadap nilai viskositas krim F1 dan F2 jika dibandingkan dengan nilai viskositas krim F1 dan F2 sebelum penyimpanan dan sesudah penyimpanan suhu 25 °C.

Pada hasil pengujian nilai daya sebar diketahui bahwa semua formula memenuhi nilai daya sebar yang diinginkan yaitu 5 - 7 cm, kecuali nilai daya sebar F1 sesudah penyimpanan suhu 50 °C [15]. Nilai daya sebar sesudah penyimpanan suhu 50 °C mengalami peningkatan, baik pada F1 maupun F2. Daya sebar krim erat kaitannya

dengan nilai viskositas krim. Semakin kecil viskositas krim maka semakin kecil tahanan atau hambatan sediaan krim untuk menyebar, sehingga nilai daya sebar meningkat [20]. Pada pengujian viskositas terjadi penurunan nilai viskositas sesudah penyimpanan suhu 50 °C, sehingga mengakibatkan peningkatan nilai daya sebar sesudah penyimpanan suhu 50 °C. Pernyataan tersebut didukung oleh hasil uji statistik yang menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu 50 °C memberikan pengaruh terhadap nilai daya sebar krim F1 dan F2 jika dibandingkan dengan nilai daya sebar krim F1 dan F2 sebelum penyimpanan dan sesudah penyimpanan suhu 25 °C.

Hasil pengujian pH sediaan krim ekstrak etanol edamame menunjukkan bahwa semua formula memiliki pH yang memenuhi kriteria yang diinginkan yaitu 5 - 7 cm [16]. Hasil uji statistik juga menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap pH sediaan krim F1 dan F2.

Simpulan dan Saran

Formulasi tidak mempengaruhi kadar genistein dalam sediaan krim m/a dan a/m. Perolehan kembali kadar genistein berturut-turut sebesar $95,4178 \pm 2,2815\%$ dan $101,8276 \pm 5,0063 \%$. Penyimpanan sediaan krim pada suhu 25 °C tidak mempengaruhi karakteristik fisika kimia, sedangkan penyimpanan pada suhu 50 °C mengakibatkan penurunan nilai viskositas dan peningkatan nilai daya sebar pada kedua krim. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah dilakukan uji efektivitas krim sebagai pemutih dan penetapan kadar total isoflavon dalam sediaan krim setelah pengujian *stress testing*.

Ucapan Terimakasih

Kepada Dirjen Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian tahun 2014.

Daftar Pustaka

- [1] Badan Pengawas Obat dan Makanan. Persyaratan teknis bahan kosmetik: keputusan kepala badan pengawas obat dan makanan RI No. HK.00.03.1.23.08.11.07517; 2011.
- [2] Badan Pengawas Obat dan Makanan. Kosmetik mengandung bahan berbahaya dan zat warna yang dilarang : keputusan kepala badan pengawas obat dan makanan RI No. HK.00.01.432.6081; 2007.
- [3] Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci.* 2011; 33(3): 210–21.
- [4] Chang T-S, Ding H-Y, Lin H-C. Identifying 6, 7, 4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69(10): 1999–2001.
- [5] Mebrahtu T, Mohamed A, Wang CY, Andebrhan T. Analysis of isoflavone contents in vegetable soybeans. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004; 59(2): 55–61.
- [6] Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM. USDA database for the isoflavone content of selected foods. Beltsville: Department of Agriculture; 2008.
- [7] Konovsky J, Lumpkin TA, McClary D. Edamame: the vegetable soybean. *Underst Jpn Food Agrimarket Multifaceted Oppor.* 1994: 173–81.
- [8] Dewi ENA. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap kadar genistein dan aktivitas hambatan tirosinase edamame (*Glycine max*) [Skripsi]. [Jember]: Universitas Jember; 2015.
- [9] Ansel HC. Pengantar bentuk sediaan farmasi. Edisi 4. Jakarta: UI Press; 2008.
- [10] Huynh K. Handbook of stability testing in pharmaceutical development. New York: Springer; 2008.
- [11] Fatmawaty A, Tjendra A, Riski R, Nisa M. Formulasi, evaluasi fisik dan permeasi krim pemutih asam kojat dengan variasi enhancer. *Maj Farm Dan Farmakol.* 2012;16(3):139–42.
- [12] Lachman L, Lieberman HA, Kang JL. Teori dan praktek farmasi industri II. Edisi 3. Jakarta: Universitas Indonesia Press;1994.
- [13] Yuan D, Chena Y, Baia X, Pana Y, Kanob Y. TLC and HPLC analysis of soy isoflavones in semen sojoe praeparatum. *Asian J Trad Med.* 2006;1:3–4.
- [14] Langenbuchner, Lange. Reologi farmasetik. Dalam: Lachman, L., Lieberman, H.A., dan Kanig, J.L. Teori dan praktik farmasi industri II. Edisi 3. Jakarta: UI-Press; 2007.
- [15] Garg A, Aggarwal D, Garg S, Singla AK. Spreading of semisolid formulations: an update. *Pharm Technol.* 2002; 26(9): 84–105.
- [16] Standar Nasional Indonesia 164954. Krim pemutih kulit. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional; 1998.
- [17] Dahlan S. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta: Salemba Medika; 2009.

- [18] Huber L. Validation and qualification in analytical laboratories. 2th ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2007.
- [19] Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.
- [20] Voight R. Buku pelajaran teknologi farmasi. Edisi 5. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 1994.