

## **Pengembangan Metode Analisis Kuantitatif Residu Antibiotik Tetrasiklin dalam Sarang Lebah Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Development of Methods for Quantitative Analysis of Tetracycline Antibiotic Residues in Beehive Using High Performance Liquid Chromatography Method

<sup>1</sup>Chairunnisa Suci Insani, <sup>2</sup>Diar Herawati E., <sup>3</sup>Nety Kurniaty

<sup>1,2,3</sup>*Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1 Bandung 40116*

*email: <sup>1</sup>annisainsani14@gmail.com, <sup>2</sup>diarmunawar@gmail.com, <sup>3</sup>netykurniaty@yahoo.com*

**Abstrak.** Telah dilakukan penelitian mengenai residu antibiotik tetrasiklin dalam sarang lebah dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan detektor UV dengan panjang gelombang 365 nm, kolom Zorbax® SB-C-18 (250 x 4,6 mm), fase gerak asam oksalohat pH 4 : metanol : asetonitril dengan perbandingan 15:28:7) dengan laju alir 1 ml/menit. Sarang lebah dipreparasi menggunakan McIlvaine-EDTA *buffer* pH 4 lalu disonikasi selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit, kemudian dilakukan pemisahan menggunakan *Solid Phase Extraction* (SPE). Dari sampel yang digunakan yaitu sarang lebah spesies *Trigona* sp menunjukkan kadar residu antibiotik tetrasiklin sebesar 1,99 ppm. Hasil validasi menunjukkan bahwa kurva kalibrasi menghasilkan linieritas yang baik ( $r^2 = 0,999$ ). Akurasi berada pada rentang 100-150%. Presisi yang dihasilkan di bawah 2%. Batas deteksi 0,102 ppm dan batas kuantifikasi 0,339 ppm.

**Kata Kunci:** Sarang lebah, tetrasiklin, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

**Abstrak.** Telah dilakukan penelitian mengenai residu antibiotik tetrasiklin dalam sarang lebah dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan detektor UV dengan panjang gelombang 365 nm, kolom Zorbax® SB-C-18 (250 x 4,6 mm), fase gerak asam oksalohat pH 4 : metanol : asetonitril dengan perbandingan 15:28:7) dengan laju alir 1 ml/menit. Sarang lebah dipreparasi menggunakan McIlvaine-EDTA *buffer* pH 4 lalu disonikasi selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit, kemudian dilakukan pemisahan menggunakan *Solid Phase Extraction* (SPE). Dari sampel yang digunakan yaitu sarang lebah spesies *Trigona* sp menunjukkan kadar residu antibiotik tetrasiklin sebesar 1,99 ppm. Hasil validasi menunjukkan bahwa kurva kalibrasi menghasilkan linieritas yang baik ( $r^2 = 0,999$ ). Akurasi berada pada rentang 100-150%. Presisi yang dihasilkan di bawah 2%. Batas deteksi 0,102 ppm dan batas kuantifikasi 0,339 ppm.

**Kata Kunci:** Sarang lebah, tetrasiklin, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

## A. Pendahuluan

Lebah madu merupakan serangga yang berperan dalam menghasilkan madu. Serangga ini mengubah nektar yang dihasilkan tanaman menjadi madu. Selanjutnya madu akan disimpan dalam sarang lebah. Lebah juga menghasilkan beberapa produk diantaranya madu, *royal jelly*, tepung sari (*pollen*), lem lebah (*propolis*), malam lebah (*beeswax*), dan racun lebah (*bee venom*) (Suranto, 2004: 4,9).

Penggunaan antibiotik dalam pemeliharaan lebah telah diketahui sejak tahun 1940. Sulfonamid, tetrasiklin, dan nitrofurantoin digunakan dalam peternakan lebah untuk mencegah dan melawan penyakit pada tanaman budidaya dan oleh peternak lebah digunakan untuk mencegah dan melawan penyakit pada lebah madu (Bargańska, 2011: 1035).

Antibiotik umumnya dimanfaatkan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri pada sarang lebah untuk mencegah tersebarnya infeksi bakteri pada lebah madu. Penggunaan antibiotik dalam jangka panjang bisa terakumulasi pada sarang lebah yang bisa berpindah pada semua produk lebah termasuk madu. *Tetracycline* (TC), *Chlortetracycline* (CTC), *Oxytetracycline* (OTC) dan *Doxycycline* (DC) adalah empat anggota dari kelompok antibiotik yang sangat umum digunakan untuk pencegahan dan pengobatan dari pertumbuhan bakteri terutama karena aktivitas spektrum yang tinggi dan luas (Satpathy, 2013: 1).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. Apakah terdapat residu antibiotik tetrasiklin dalam sarang lebah?
2. Jika ada, berapa kadar residu antibiotik tetrasiklin dalam sarang lebah?
3. Apakah metode yang digunakan memberikan hasil analisis yang valid ?

Dari rumusan masalah diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui dan menganalisis kadar residu antibiotik tetrasiklin pada sarang lebah dan menentukan metode yang tepat agar memberikan hasil yang valid. Penelitian ini diharapkan akan bermanfaat bagi masyarakat dan peneliti karena adanya kandungan antibiotik tetrasiklin dalam sarang lebah yang melebihi batas akan mengkontaminasi produk yang dihasilkan lebah dan akan menyebabkan resistensi terhadap antibiotik tetrasiklin akibat tingginya residu yang terkandung.

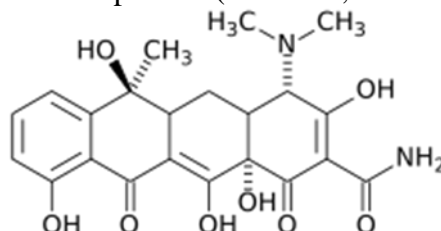
## B. Landasan Teori

Lebah madu dapat menghasilkan beberapa produk diantaranya adalah madu, royal jelly, serbuk sari, propolis, malam, dan racun lebah. Menurut Situmorang (2014: 29-30) terdapat beberapa penyakit yang menyerang lebah, diantaranya :

1. *American Foulbrood* (AFB)  
Penyakit ini disebabkan oleh jasad renik yang tergolong bakteri yaitu *Bacillus larvae*. Kelompok yang diserang adalah anakan lebah. Larva yang busuk berbau menyengat, lama kelamaan akan kering, dan menempel pada dinding dasar sel sehingga sulit dibersihkan.
2. *European Foulbrood* (EFB) disebabkan oleh jasad renik pengganggu yang tergolong bakteri yaitu *Meligococcus pluton*. Pembusukan larva mempunyai gejala seperti AFB tetapi tidak berbau menyengat.

Antibiotik adalah senyawa organik yang dihasilkan oleh berbagai spesies mikroorganisme dan bersifat toksik terhadap spesies mikroorganisme lain. Sifat toksik senyawa-senyawa yang terbentuk mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri (efek bakteristatik) dan bahkan ada yang langsung membunuh bakteri (efek bakterisid) yang kontak dengan antibiotik tersebut (Sumardjo, 2009:423).

Antibiotika golongan tetrasiklin merupakan antibiotika yang mempunyai spektrum luas. Tetrasiklin diperoleh dari hasil fermentasi *Streptomyces aureofaciens* pada tahun 1948. Tetrasiklin pertama kali diperoleh secara kimiawi yaitu dehalogenasi klortetrasiklin, tetapi sekarang dapat diperoleh dari biakan *Sterptomycetes viridivaciens* (Ibrahim, 1990: 88). Tetrasiklin bekerja dengan berikatan pada mRNA dan subunit ribosom ke 30, sisi pengikatan menjadi salah satu yang penting dalam kemampuan tetrasiklin untuk menghambat sintesis protein (Bowman, 1980: 34.41).



**Gambar 1.** Struktur Tetrasiklin

Resisten adalah kondisi dimana antibiotik gagal membunuh patogen untuk menyembuhkan penyakit. Munculnya resisten sering dimulai dengan populasi patogen besar dimana sebagian kecil secara alami resisten terhadap antibiotik, baik melalui perubahan spontan atau melalui perolehan dari gen resistensi mikroba lainnya. Penggunaan berulang dari antibiotik tertentu menyebabkan sebagian besar populasi patogen terdiri dari sel-sel resisten (Drlica, 2011: 1).

Dalam penelitian ini digunakan beberapa teknik pemisahan diantaranya:

1. Sentrifugasi

Sentrifugasi adalah metode dimana suspensi padat dalam fase cair berputar dengan kecepatan tinggi. Sebagai hasilnya fase padat terpisahkan dan terbentuk sedimen di bagian bawah dan fase cair sebagai supernatan di bagian atas. Pada saat sentrifugasi, gaya sentrifugal mendorong partikel padat dengan densitas yang lebih tinggi keluar yang terkumpul sedikit di bagian bawah tabung sentrifugasi dan terbentuk pellet. Kumpulan partikel padat memfasilitasi pemisahan supernatan yang dituang keluar (Mukherjee, 1988: 122).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah salah satu teknik pemisahan yang digunakan dalam analisis. Pada teknik ekstraksi digunakan pelarut yang melarutkan komponen aktif dan komponen aktif ditarik dengan pelarut ekstraksi yang cocok (Kasture,dkk., 2007: 13-1). Ekstraksi fase padat atau SPE (*Solid Phase Extraction*) adalah metode yang digunakan untuk mengisolasi dan pengekstraksi analit dapat berupa gas, cairan atau zat cair (biasanya) yang mengalir melewati sampel dengan berpindah dan beretensi (terserap) pada fase padat. Fase padat lalu diisolasi dari sampel dan analit diperoleh kembali dari elusi menggunakan cairan atau zat cair, atau oleh desorpsi termal ke fase gas (Pawliszyn, 2002:341).

3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Banyak kelebihan metode ini dibandingkan metode lainnya diantaranya adalah mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor, dan kolom dapat digunakan kembali (Putra, 2004:1).

Menurut Kazakevich (2007:460-483) metode kuantitatif untuk pengujian validasi mengandung beberapa parameter yang ditentukan, yaitu

1. Linieritas

Uji linieritas bertujuan untuk menunjukkan bahwa seluruh sistem analisis (termasuk detektor dan perolehan data) menunjukkan respon linear dan berbanding lurus atas rentan konsentrasi relevan untuk target konsentrasi dari analit.

2. Akurasi

Uji akurasi dimaksudkan untuk menunjukkan kedekatan dari kecocokan antara nilai yang ditemukan dan nilai yang diterima baik sebagai nilai lazim yang benar atau diterima sebagai nilai acuan.

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{konsentrasi analit}}{\text{konsentrasi standar}} \times 100 \% \dots\dots\dots(1)$$

3. Presisi

Presisi menyajikan sebuah indikasi kesalahan acak dan bisa dipecah menjadi pengulangan dan ketelitian menengah. Prosedur ini hanya boleh dilakukan ketika seluruh prosedur metode analisis diselesaikan.

$$SD = \frac{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2}}{n-1} \dots\dots\dots(2)$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3)$$

Dimana :

RSD = Standar Deviasi Relatif (%)

SD = Standar Deviasi

$\bar{x}$  = x rata-rata

4. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) ditentukan untuk semua uji ketidakmurnian (termasuk analisis residual selama verifikasi pembersihan). Definisi LOD yang didefinisikan oleh USP sebagai parameter dari uji batas, konsentrasi terendah dari analit yang dapat dideteksi, tetapi tentu tidak kuantitatif, dibawah kondisi percobaan yang dinyatakan. Sebaliknya, LOQ didefinisikan sebagai parameter uji kuantitatif untuk level terendah senyawa dalam matriks sampel. LOQ adalah konsentrasi terendah dalam sampel yang dapat diukur dengan akurasi dan presisi tingkat yang bisa diterima.

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum(y-\bar{y})^2}}{n-2} \dots\dots\dots(4)$$

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} \dots\dots\dots(5)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} \dots\dots\dots(6)$$

### C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Penelitian hanya menggunakan 1 sampel sarang lebah dari spesies *Trigona sp.*, pembudidayaan di Kampung Cibeusi, Desa Palasari, Ciater, Subang, merupakan sarang lebah yang dibudidayakan di daerah hutan yang jauh dari pemukiman. Alasan penggunaan sampel hanya dari satu spesies lebah dikarenakan dalam penelitian ini bertujuan untuk menemukan metode yang cocok untuk analisis residu antibiotik dalam sarang lebah.

Terlebih dahulu dilakukan uji kesesuaian sistem. Tujuan dilakukan uji kesesuaian sistem adalah untuk memastikan bahwa instrumen yang kita gunakan bekerja secara benar, dengan syarat nilai % RSD <2 %.

Dari pengujian diperoleh data sebagai berikut :

**Tabel 1.** Data hasil uji kesesuaian sistem

No	Luas Area	Waktu Retensi (menit)
1	6401883	2,850
2	6403325	2,847
3	6371543	2,847
4	6437841	2,847
5	6548004	2,853
6	6508279	2,847
7	6486789	2,850
$\bar{x}$	6451094,857	2,849
SD	64734,598	0,002
% RSD	1,003	0,082

Dari hasil perhitungan didapat nilai simpangan baku 64734,598 dengan nilai koefisien variansi atau nilai RSD sebesar 1,003 %. Dapat disimpulkan bahwa perolehan nilai uji kesesuaian sistem memenuhi persyaratan karena kurang dari 2%.

Sebelum dilakukan analisis terlebih dahulu dilakukan persiapan atau preparasi sampel sarang lebah dengan cara disentrifugasi kemudian dilakukan proses ekstraksi menggunakan ekstraksi padat cair (SPE). Tujuan dilakukannya proses ekstraksi adalah untuk memisahkan analit dari komponen lain yang akan mengganggu hasil analisis. Proses preparasi sampel dilakukan hanya menggunakan satu teknik ekstraksi yaitu SPE karena produsen menyatakan bahwa SPE dapat langsung memisahkan analit dari matriks lain jika penggunaannya benar. Maka dari itu, dalam penelitian ini proses ekstraksinya hanya menggunakan SPE, untuk melihat apakah ekstraksi jenis ini memang mampu memisahkan analit dengan matriks lain tanpa dilakukan proses ekstraksi lainnya seperti ekstraksi cair-cair.

Sampel dipotong kecil-kecil terlebih dahulu kemudian ditambahkan larutan penyangga McIlvaine-EDTA pH 4, kemudian disonikasi selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Penggunaan larutan penyangga McIlvaine-EDTA bertujuan untuk mempertahankan tetrasiklin agar tidak rusak dan tetap stabil, selain itu EDTA berfungsi sebagai agen pengkhelet untuk mencegah senyawa logam agar tidak terikat pada bagian adsorpsi dalam kolom SPE sehingga akan meningkatkan efisiensi pemurniaan dari tetrasiklin.

Setelah sampel ditambahkan larutan penyangga McIlvaine-EDTA, kemudian dilakukan sonikasi agar tetrasiklin yang terdapat pada sampel melarut secara homogen dalam larutan yang ditambahkan. Selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan analit dari komponen lain yang tidak diinginkan. Prinsipnya yakni memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas (supernatan). Bagian supernatan diambil untuk selanjutnya dilakukan proses ekstraksi padat cair (SPE).

*Solid Phase Extraction* (SPE) dilakukan menggunakan kolom Oasis HLB, tujuan dilakukan ekstraksi padat cair adalah untuk memisahkan analit dari komponen lain yang tidak diinginkan yang tidak terpisah saat dilakukan sentrifugasi. Kolom SPE terlebih dahulu diaktifkan menggunakan 1 ml metanol dan 1 ml aquabides. Tahapan ini disebut tahap pengkondisian, tujuannya untuk membasahi permukaan penjerap dan untuk menciptakan nilai pH yang sama, sehingga perubahan-perubahan kimia yang tidak diharapkan ketika sampel dimasukkan dapat dihindari. Setelah itu dimasukkan sampel sebanyak 3 ml ke dalam kolom SPE, tahapan ini disebut tahap retensi dimana sampel dilewatkan melalui kolom untuk menahan analit yang diharapkan, sementara komponen lain terelusi. Selanjutnya kolom dicuci dengan 3 ml aquabides, tahapan ini bertujuan untuk menghilangkan seluruh komponen yang tidak tertahan oleh kolom selama tahap retensi. Tahapan terakhir adalah elusi menggunakan 3 ml fase gerak, tahapan ini bertujuan untuk mengambil analit yang dikehendaki yang tertahan pada kolom. Hasil elusi kemudian dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan diencerkan menggunakan metanol sampai tanda batas.

Ekstrak dari sampel yang dihasilkan dari proses ekstraksi menggunakan SPE dan telah diencerkan selanjutnya disaring menggunakan membran filter ukuran 0,45  $\mu\text{m}$  untuk dianalisis menggunakan KCKT. Sistem yang digunakan adalah fasa terbalik dimana fase gerak bersifat lebih polar dibandingkan fase diam. Fase gerak berupa asam oksalat pH 4-metanol-asetonitril dengan perbandingan 15 : 28 : 7.

Hasil analisis tetrasiklin dalam sarang lebah sebagai berikut:

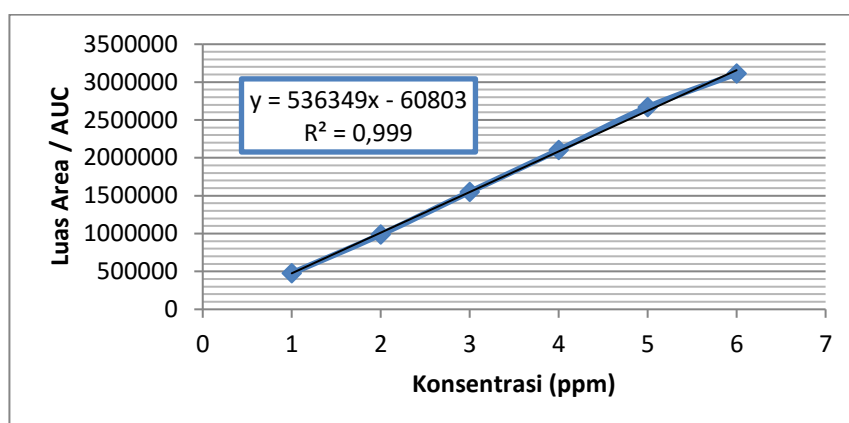
**Tabel 2.** Hasil identifikasi tetrasiklin dalam sampel

Nama	Waktu Retensi (menit)	Luas Area
Standar	2,850	6401883
Sampel	2,857	1130877

Dari tabel hasil analisis tetrasiklin dalam sampel sarang lebah dilihat dari waktu retensi yang dihasilkan dibandingkan dengan waktu retensi standar baku tetrasiklin dapat disimpulkan bahwa sampel yang digunakan mengandung tetrasiklin (hasil positif). Kemudian setelah dilakukan pengecekan menggunakan baku tinambah pada sampel, puncak yang dihasilkan mengalami peningkatan. Hal ini membuktikan bahwa sampel mengandung tetrasiklin sehingga kadar sampel dapat ditentukan yaitu sejumlah 1,99 ppm.

Hasil validasi analisis yang dilakukan:

1. Linieritas



**Gambar 1.** Kurva kalibrasi

Dari kurva kalibrasi, didapatkan persamaan regresi linier  $y = 536349x - 60803$  dan nilai  $r^2$  yang diperoleh adalah 0,999. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa pengujian linieritas ini memenuhi persyaratan karena nilai koefisien korelasi ( $r$ ) mendekati 1.

2. Akurasi

**Tabel 3.** Data perhitungan akurasi

No	C <sub>Baku Pembanding</sub> (ppm)	Luas Area	C <sub>Hasil Analisis</sub> (ppm)	% Perolehan Kembali
1	2	1716641	3,087	154,362
2	2	1688089	3,034	151,700
3	2	1689676	3,037	151,848
			$\bar{X}_1$	152,637
4	3	1959980	3,541	118,031
5	3	1960043	3,541	118,035
6	3	1984345	3,586	119,545
			$\bar{X}_2$	118,537
7	4	2242687	4,068	101,701
8	4	2256034	4,092	102,323
9	4	2259925	4,100	102,504
			$\bar{X}_3$	102,176
			$\bar{X}_{123}$	124,45

Menurut *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, untuk % perolehan kembali pada penetapan kadar cemaran pada 1 level dengan 3 kali pengujian rentang % perolehan kembali adalah 80 – 120 %. Dari data yang didapat ada satu konsentrasi pengujian yang melebihi rentang, hal ini dikarenakan memang konsentrasi tetrasiklin yang terdapat di dalam sampel cukup besar yaitu sekitar 2 ppm, jadi % perolehan kembali yang dihasilkan tidak memenuhi persyaratan validasi.

### 3. Presisi

**Tabel 4.** Data nilai presisi

No	C <sub>Baku Pembanding</sub> (ppm)	Luas Area	C <sub>Hasil</sub> (ppm)
1	3	2002617	3,620
2	3	1972383	3,564
3	3	1968811	3,557
4	3	1984345	3,586
5	3	1960043	3,541
6	3	1959980	3,540
		$\bar{x}$	3,568
		SD	0,030
		% RSD	0,856

### 4. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi yang memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} = \frac{3 \times 18161,632}{536349} = 0,102 \text{ ppm}$$

Batas kuantifikasi adalah kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} = \frac{10 \times 18161,632}{536349} = 0,339 \text{ ppm}$$

Dari hasil perhitungan LOD dan LOQ di atas, dapat disimpulkan bahwa batas deteksi dan batas kuantitasi memenuhi persyaratan karena nilainya berada di bawah kadar sampel yang didapatkan.

## D. Kesimpulan

Metode analisis kuantitatif menggunakan SPE kolom OASIS<sup>®</sup> HLB dan KCKT fase terbalik kolom C-18 memberikan hasil kadar 1,99 ppm pada sarang lebah spesies *Trigona* sp. Hasil validasi menunjukkan bahwa kurva kalibrasi menghasilkan linieritas yang baik ( $r^2 = 0,999$ ). Akurasi berada pada rentang 100-150%. Presisi yang



dihasilkan dengan nilai % RSD 0,856 memenuhi persyaratan yaitu  $\leq 2\%$ . Batas deteksi menunjukkan nilai 0,102 ppm dan batas kuantifikasi menunjukkan nilai 0,339 ppm dan memenuhi persyaratan validasi.

#### E. Saran

Perlu dikembangkan metode preparasi yang lebih baik sehingga kromatogram memberikan hasil yang lebih baik.

#### Daftar Pustaka

- Ahuja, Satinder dan Michael W. Dong. 2005. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. United Kingdom : Elsevier
- Bargańska, Żaneta, Marek Ślebioda, Jacek Namieśnik. 2011. *Determination of Antibiotic Residues in Honey*. Gdansk University of Technology : Elsevier Publication.
- Bowman, W. C. dan M. J. Rand. 1980. *Textbook of Pharmacology 2nd Edition*. London : Blackwell Scientific Publications.
- Drlica, Karl dan David S. Perlin. 2011. *Antibiotic Resistance : Understanding and Responding to an Emerging Crisis*. New Jersey : Pearson Education Inc.
- Kasture A. V., dkk. 2007. *Pharmaceutical Analysis Volume I*. Mumbai : Pragati Book Corner.
- Kazakevich, Yuri dan Rosario Lobrutto. 2007. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey : John Willey & Sons Inc Publication.
- Mukherjee, Kanai L. 1988. *Medical Laboratory Technology : A Procedure Manual for Routine Diagnostic Tests*. India : Tata McGraw-Hill.
- Pawliszyn, J. 2002. *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*. Amsterdam : Elsevier Science.
- Putra, Effendy De Lux. 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*. Medan : USU Digital Library
- Satphaty, Goury dan J. S. Chadha. 2013. *Quantitative LC-MS/MS Analysis of LC-MS/MS System*. USA : Bruker Daltonics
- Situmorang, Rospita O. P. dan Aam Hasanudin. 2014. *Panduan Manual Budidaya Lebah Madu*. Aek Nauli : Balai Penelitian Kehutanan Aek Nauli
- Sumardjo, Damin. 2006. *Pengantar Kimia : Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Jakarta : Buku Kedokteran EGC
- Suranto, Adji. 2004. *Khasiat dan Manfaat Madu Herbal*. Depok : PT AgroMedia Pustaka.