



Validation and development of UV-Vis spectrophotometer analysis methods for alpha-tocopherol acetate

Validasi dan pengembangan metode analisis spektrofotometer UV-Vis pada alfa tokoferol asetat

Arif Al Iman¹, Winni Nur Auli^{1*}, Sukrasno²

¹ Program Studi Farmasi, Institut Teknologi Sumatera, Lampung, Indonesia

² Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jawa Barat, Indonesia

*Corresponding author: winni.auli@fa.itera.ac.id

Abstract

Background: The COVID-19 pandemic had caused the consumption of vitamins in the community to increase with the aim of maintaining immunity in the body.

Objective: This study aims to develop an analysis method with a UV-Vis spectrophotometer, which is considered an alternative analysis method that is easier, more practical, and cheaper.

Method: Methods for analyzing alpha-tocopherol acetate are validated through specificity tests, linearity measurements, precision tests, accuracy tests, determination of detection limits, determination of quantitation limits, and determination of range using ethanol p.a solvent and UV-Vis Spectrophotometer instruments. Then, examine the alpha tocopherol acetate content of vitamin E dietary supplements.

Results: The specificity test showed that matrix had no significant effect on the analysis, the linearity test met the requirements with a concentration range of 20–60 µg/mL ($r = 0.9991$), the accuracy test was 99.897–100.315%, intraday and interday precision tests were obtained with %RSD less than 2%, the LOD value was 1.859 µg/mL and the LOQ value was 5.635 µg/mL. The determination of levels of vitamin E in dietary supplements showed levels for brand A of 100.508% and brand B of 100.089%.

Conclusion: The analytical method developed had met the validation requirements, and the levels of vitamin E food supplements had met the USP requirements.

Keywords: method validation, UV-Vis spectrophotometer, alpha tocopherol acetate

Intisari

Latar belakang: Pandemi COVID-19 menyebabkan penggunaan vitamin di masyarakat meningkat dengan tujuan agar imunitas pada tubuh tetap terjaga.

Tujuan: Mengembangkan dan memvalidasi metode analisis vitamin E dengan tujuan uji kualitatif dan kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang dinilai sebagai metode analisis alternatif yang lebih mudah, praktis, dan murah.

Metode: Validasi metode yang dilakukan untuk analisis senyawa alfa tokoferol asetat meliputi uji spesifisitas, pengukuran linieritas, uji presisi, uji akurasi, penentuan limit deteksi, penentuan limit kuantifikasi, dan penentuan rentang menggunakan pelarut etanol p.a. dan alat spektrofotometer UV-Vis. Metode yang telah memenuhi kriteria validasi kemudian digunakan untuk pengecekan kadar kandungan alfa tokoferol asetat dalam suplemen vitamin E.

Hasil: Penelitian ini memberikan hasil yaitu matriks tidak teranalisis pada uji spesifisitas, uji linieritas telah memenuhi syarat dengan rentang konsentrasi 20–60 µg/mL ($r^2 = 0,9991$), uji akurasi 99,897–100,315%, uji presisi *interday* dan *intraday* didapatkan hasil %RSD kurang dari 2%, nilai LOD 1,859 µg/mL dan nilai LOQ 5,635 µg/mL. Penetapan kadar sediaan vitamin E telah memenuhi ketentuan yaitu 100,508% dan 100,089%.

Kesimpulan: Metode yang dikembangkan telah memenuhi ketentuan validitas dan kadar vitamin E pada sampel sesuai dengan ketentuan USP.

Kata kunci: validasi metode, spektrofotometer UV-Vis, alfa tokoferol asetat

1. Pendahuluan

Virus yang menimbulkan gejala seperti pneumonia yang ditemukan China pada tahun 2019 dikenal sebagai sindrom pernapasan akut coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Organisasi Kesehatan Dunia

(WHO) telah mengklasifikasikan virus ini menjadi pandemi. Gejala infeksi SARS-CoV-2 menunjukkan dari tanpa gejala hingga berat dengan batuk, demam, dan sesak napas. Dalam kasus yang lebih parah, komplikasi dapat mencakup gangguan akut pada pernapasan, komplikasi akut pada jantung, syok septik, disfungsi organ bahkan kematian. Gejala ini diyakini terkait dengan badai sitokin, dimana replikasi virus memicu pelepasan sitokin yang kuat secara tidak normal dan rangsangan terkait kekebalan lainnya, yang mengakibatkan peradangan berlebih (Iddir *et al.*, 2020). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa konsumsi suplemen memberikan efek penyembuhan pada pasien dengan COVID-19. Suplemen makanan yang direkomendasikan untuk COVID-19 yaitu vitamin D, C, E dan Zn (Shakoor *et al.*, 2021). Vitamin E dianggap sebagai antioksidan kuat yang mampu menahan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan partikel radikal bebas (Jovic *et al.*, 2020).

Vitamin E menghambat aktivitas Protein Kinase C (PKC) dengan meningkatkan defosforilasi PKC- α melalui aktivasi protein fosfatase 2A. Penghambatan PKC oleh vitamin E terjadi pada berbagai sel sehingga menyebabkan penghambatan agregasi trombosit, mengurangi proliferasi monosit; makrofag; neutrophil; dan sel otot polos vaskular, dan penurunan produksi superoksida pada neutrofil maupun makrofag. Hal tersebut menyebabkan imunitas pada tubuh dapat lebih stabil (Lee & Han, 2018). Vitamin E adalah istilah senyawa untuk empat struktur tokoferol (α -, β -, γ -, dan δ -tokoferol) dan empat struktur tocotrienol (α -, β -, γ -, dan δ -tocotrienol) yang ditemukan dalam makanan. Bentuk-bentuk ini memiliki aktivitas antioksidan, tetapi tidak dapat dikonversi, hanya α -tokoferol yang memenuhi kebutuhan vitamin E manusia. Tokoferol memiliki cincin kromanol dan ekor fitil, sedangkan tokotrienol memiliki cincin kromanol dan ekor tak jenuh. Bentuk α -, β -, γ -, dan δ - berbeda dalam jumlah dan posisi gugus metil pada struktur kromanol. Tokoferol alami hanya memiliki stereokimia RRR, tetapi tokoferol sintetis adalah campuran dari delapan stereoisomer (RRR-, RSR-, RRS-, RSS-, SRR-, SSR-, SRS-, SSS-), karena ada tiga atom karbon asimetris (2R, 4'R, 8'R) yang ada di ekor fitil (Traber, 2007). Struktur ester alfa tokoferol memiliki sifat yang lebih stabil dari oksidasi dibandingkan bentuk aktif alfa tokoferol (Sunaric *et al.*, 2017).

Metode standar analisis senyawa vitamin E yang telah ditetapkan adalah menggunakan kromatografi gas (Kemenkes RI, 2020). Beberapa metode analisis lain yang telah dikembangkan yaitu menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Fithriyah, 2013), dan spektrofotometri (Irawati, 2011). Metode yang telah disebutkan memiliki keterbatasan seperti larutan standar tertinggal di injektor, kolom mudah tertutup kotoran, kemurnian larutan tinggi, biaya tinggi, peralatan rumit dan perawatan sulit (Prabowo *et al.*, 2012). Analisis menggunakan spektrofotometri UV-Visible juga sudah banyak berkembang dengan pemanfaatan berbagai reaksi kimiawi kompleks dan penggunaan pelarut yang toksik. Oleh sebab itu, diperlukan metode yang lebih

cepat, mudah, murah, dan lebih ramah lingkungan yang dapat menganalisis banyak zat organik dan anorganik, selektif, mempunyai ketelitian yang tinggi dengan kesalahan relatif sebesar 1-3%. Metode yang dapat dikembangkan adalah spektrofotometer Ultra Violet – *Visible* (UV-Vis). Pada beberapa penelitian sebelumnya, senyawa yang digunakan adalah α -tokoferol. Sedangkan pada penelitian ini dilakukan untuk menentukan uji kualitatif dan kuantitatif pada α -tokoferol asetat sebagai bentuk ester dari α -tokoferol. Sediaan vitamin saat ini sudah banyak yang menggunakan bentuk ester dibandingkan senyawa α -tokoferol karena alasan stabilitas yang lebih baik. Pengembangan metode dilakukan menggunakan pelarut yang lebih tidak toksik yaitu etanol. Pemilihan etanol sebagai pelarut karena merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa dengan tingkat kepolaran yang berbeda (Harborne, 1987). Berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi VI menyebutkan bahwa bentuk vitamin E lain (α -tokoferol asetat) larut dalam etanol dengan makna 10-30 mL pelarut yang diperlukan untuk melarutkan 1 gram zat vitamin E (α -tokoferol asetat) (Kemenkes RI, 2020).

Validasi metode merupakan kegiatan yang bertujuan untuk mengkonfirmasi bahwa metode yang dilakukan untuk suatu uji tertentu telah sesuai dengan melihat parameter-parameter yang telah ditetapkan. Parameter yang dapat digunakan untuk pengembangan metode analisis yaitu rentang (*range*), akurasi (*accuracy*), presisi (*precision*), linieritas (*linearity*), batas kuantitasi (LOQ), batas deteksi (LOD), dan spesifisitas (*specificity*) (ICH, 2021; Harmita, 2004). Penelitian ini dilakukan untuk melakukan validasi metode analisis vitamin E baik secara kualitatif maupun kuantitatif menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis.

2. Metode

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa *Ultrasonic cleaner* (Elmasonic S180H), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), pipet mikro, pipet volume, neraca analitik spatula, gelas Beaker, dan labu volume.

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar Alfa tokoferol asetat (DSM Nutritional Products, Netherland), etanol p.a (*Merck*[®], Germany), suplemen makanan vitamin E, dan matriks buatan (sorbitol dan *apple essence*) yang berasal dari komposisi salah satu sampel yang akan dianalisis.

2.3 Sampel

Sampel yang diuji berupa dua merek vitamin E pasaran yang mengandung zat aktif alfa tokoferol asetat.

2.4 Pengembangan dan validasi metode analisis

2.4.1 Penentuan spesifisitas

Penentuan spesifisitas dilaksanakan dengan mempertimbangkan spektrum larutan standar, larutan sampel dan matriks buatan dengan jumlah yang sama yaitu 40µg/mL. Matriks buatan diperoleh dari komposisi yang tertera pada kemasan salah satu sampel yang mencantumkan sorbitol dan *apple essence*. Pengujian dilakukan dengan pengecekan spektrum larutan-larutan yang telah dibuat di spektrofotometer UV-Vis untuk diamati spektrum UV yang terbentuk.

2.4.2 Preparasi larutan standar alfa tokoferol asetat

Sejumlah 100mg alfa-tokoferol asetat ditimbang ke dalam labu ukur 100mL dan ditambahkan dengan etanol pro analisis sampai tanda batas kemudian dihomogenkan. Didapatkan larutan stok standar sebanyak 1mg/mL (1000µg/mL = 1000ppm).

2.4.3 Penentuan panjang gelombang maksimal

Standar dibuat dengan konsentrasi 100 µg/mL dengan cara memipet 1 mL stok standar dan ditambahkan 10 mL etanol p.a, kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum yang terlihat pada spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm.

2.4.4 Penentuan kurva kalibrasi dan pengujian linearitas

Larutan stok standar diencerkan dengan seri konsentrasi 20, 30, 40, 50, dan 60 µg/mL, kemudian dilakukan pengecekan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil yang diperoleh selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linier ($y=a+bx$) dan menghitung nilai r dari persamaan garis linier.

2.4.5 Pengujian akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan konsentrasi dari metode yang diusulkan pada tiga tingkat konsentrasi yang berbeda yaitu 80, 100, dan 120 %. Perhitungan dilakukan pada setiap tingkat konsentrasi awal dan akhir larutan standar dan % *recovery*. Uji akurasi menggunakan metode *Certified Reference Material* (CRM). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) dianalisis kadar yang sebenarnya berdasarkan absorbansi yang diperoleh (Harmita, 2004). Berikut ini adalah rumus perhitungannya:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi Uji}}{\text{Konsentrasi Teori}} \times 100\%$$

2.4.6 Pengujian presisi

Untuk menentukan ketepatan metode ini, standar alfa-tokoferol asetat diperiksa pada hari yang sama (*intraday*) dan pada hari yang berbeda (*interday*) selama tiga hari untuk melihat besar absorbansi yang dihasilkan. Semua kegiatan dilakukan dalam replikasi sebanyak tiga pada standar alfa-tokoferol asetat. Hasil yang diperoleh kemudian dihitung nilai %RSD. Berikut ini adalah rumus perhitungannya:

$$\%RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan:

S = *Standard Deviation*

\bar{x} = Rata-Rata

2.4.7 Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas nilai kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x) (Harmita,2004).

Berikut adalah rumus perhitungan LOD dan LOQ:

$$LOD = \frac{3,3 \times \left(\frac{Sy}{x}\right)}{b} \quad LOQ = \frac{10 \times \left(\frac{Sy}{x}\right)}{b}$$

Keterangan:

Sy/x = *Residual standard deviation*

b = *slope*

2.4.8 Penentuan rentang

Batas terendah dan tertinggi ditentukan dengan menghitung konsentrasi analit yang memenuhi persyaratan presisi, akurasi, dan linearitas.

2.4.9 Analisis kadar suplemen vitamin E

Sejumlah suplemen vitamin E berbentuk kapsul (sebanyak sepuluh kapsul), tiap merek A dan B, dilakukan uji keseragaman bobot sediaan. Kemudian bobot isi per kapsul dihitung. Sediaan A dilarutkan dengan 100mL etanol p.a sehingga diperoleh larutan stok sampel A kemudian diencerkan 20x. Sediaan merek B dilarutkan dengan 100 mL etanol p.a hingga diperoleh larutan stok sampel B kemudian diencerkan 40x (USP, 2018).

3. Hasil dan pembahasan

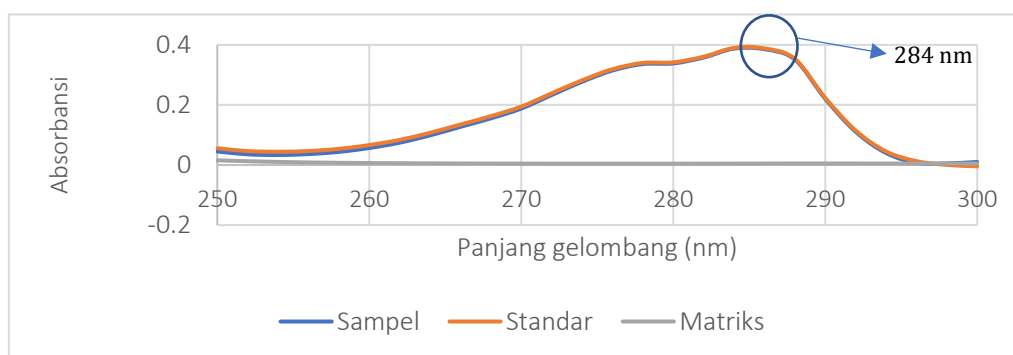
3.1 Pengembangan dan optimasi metode spektrofotometer UV-Vis

Pengembangan metode analisis alfa tokoferol asetat dengan menggunakan pelarut etanol p.a dilakukan dengan penentuan panjang gelombang maksimum alfa tokoferol asetat dengan pelarut

tersebut menggunakan *scanning method* pada rentang panjang gelombang 200 – 400 nm. Didapatkan panjang gelombang maksimum sesuai dengan pustaka yaitu 284 nm (Ng & May, 2012).

3.2 Uji spesifisitas

Pada pengujian spesifisitas, perlu dilibatkan demonstrasi penentuan zat aktif dengan excipien. Hal ini dilakukan untuk menunjukkan bahwa hasil pengujian tidak terpengaruh oleh keberadaan bahan excipien tersebut (ICH, 2021). Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat terlihat bahwa matriks buatan dan matriks pada sediaan sampel di pasaran tidak berpengaruh signifikan terhadap pembacaan alfa tokoferol asetat pada konsentrasi yang sama (Gambar 1).



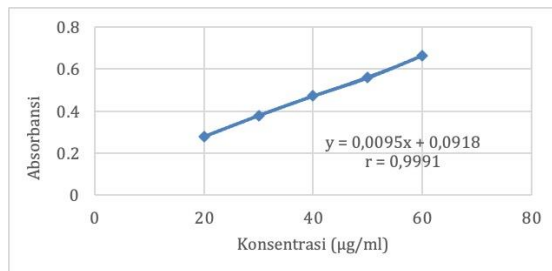
Gambar 1. Spektrum UV sampel, standar, dan matriks

3.3 Uji linieritas

Pengujian linieritas dilakukan dengan menggunakan lima seri konsentrasi sehingga diperoleh konsentrasi berkisar dari 20-60 $\mu\text{g/mL}$ untuk alfa tokoferol asetat standar sehingga didapatkan hasil berupa terdapat pengaruh besarnya konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi yang dihasilkan. Persamaan regresi linier yang didapatkan adalah $y = 0,0095x + 0,0918$ (Gambar 2) dengan koefisien korelasi 0,9991 dan nilai V_{x0} sebesar 1,408% dengan syarat linieritas yaitu $r > 0,999$ (Harmita, 2004).

Tabel 1. Uji linieritas larutan standar alfa tokoferol asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi rata-rata \pm SD
60	0,665 \pm 0,002
50	0,559 \pm 0,0003
40	0,473 \pm 0,0005
30	0,380 \pm 0,001
20	0,280 \pm 0,0003



Gambar 2. Kurva linieritas larutan standar alfa tokoferol asetat

3.4 Uji presisi

3.4.1 Uji presisi intraday

Penentuan presisi *intraday* alfa tokoferol asetat standar dengan metode spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan konsentrasi yang sama dengan enam kali replikasi. Pengujian presisi bertujuan untuk menunjukkan ketelitian metode yang sedang dilakukan. Hasil perhitungan % RSD alfa tokoferol asetat dengan konsentrasi setara 40 µg/mL yaitu 0,310% (Tabel 2) dengan batas penerimaan %RSD adalah <2%.

Tabel 2. Uji presisi *intraday*

Konsentrasi	Absorbansi	Rata-rata absorbansi ± SD	RSD (%)
40 µg/mL	0,475	0,473 ± 0,001	0,310
	0,474		
	0,473		
	0,473		
	0,472		
	0,476		

3.4.2 Presisi interday

Penentuan presisi *interday* alfa tokoferol asetat standar dilaksanakan selama 3 hari dengan konsentrasi yang sama. Perhitungan presisi *interday* diperoleh RSD sebesar 0,122% (Tabel 3) dengan batas penerimaan % RSD adalah <2% (Harmita, 2004).

Tabel 3. Uji presisi *interday*

Hari ke-	Rata-rata absorbansi ± SD
1	0,473 ± 0,001
2	0,472 ± 0,001
3	0,473 ± 0,001
RSD (%)	0,122

3.5 Uji akurasi

Metode akurasi dilakukan dengan melakukan pengukuran pada standar alfa tokoferol asetat dengan tiga tingkat konsentrasi. Kuantitas standar setara dengan 32, 40, dan 48 µg/mL. Hasil uji

akurasi yang diperoleh sebesar 99,956, 100,315, dan 99,897% (Tabel 4) dengan batas penerimaan %*recovery* adalah 98%-102% (Harmita, 2004).

Tabel 4. Uji akurasi

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi	% <i>recovery</i>	Rata-rata % <i>recovery</i>
32	0,398	100,723	99,956
	0,394	99,407	
	0,395	99,736	
40	0,473	100,315	100,315
	0,472	100,052	
	0,474	100,578	
48	0,550	100,482	99,897
	0,548	100,043	
	0,544	99,167	

3.6 Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Nilai batas deteksi diperoleh hasil sebesar 1,859 µg/mL yang memiliki arti bahwa konsentrasi atau jumlah minimal analit dalam sampel yang masih menunjukkan nilai absorbansi pada instrumen tanpa harus memenuhi kriteria akurasi dan presisi adalah 1,859 µg/mL. Penetapan nilai batas kuantifikasi memberikan hasil sebesar 5,635 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi atau jumlah minimal analit dalam sampel yang masih dapat diukur secara akurat oleh alat adalah 5,635 µg/mL.

3.7 Penentuan rentang

Rentang konsentrasi yang memenuhi ketentuan presisi, akurasi, dan linieritas adalah berkisar 20-60 µg/mL.

3.8 Penetapan kadar suplemen vitamin E

Menurut *United States Pharmacopeia* (USP) rentang kadar vitamin E pada sediaan kapsul adalah 95-120% sehingga berdasarkan hasil yang diperoleh telah memenuhi persyaratan (USP, 2018).

Tabel 5. Uji kadar alfa tokoferol asetat pada sediaan

Merek	Klaim Label (IU)	Absorbansi	Rataan absorbansi ± SD	Rataan konsentrasi ± SD (µg/ml)	Kadar* (IU)	Kadar (%)
A	100	0,411	0,411 ± 0,003	33,529 ± 0,386	100,508	100,508
		0,410				
		0,418				
		0,413				
		0,409				
		0,409				
B	200	0,408	0,410 ± 0,003	33,670 ± 0,362	200,178	100,089

Merek	Klaim Label (IU)	Absorbansi	Rataan absorbansi \pm SD	Rataan konsentrasi \pm SD ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kadar* (IU)	Kadar (%)
		0,407				
		0,411				
		0,417				
		0,408				
		0,411				

*1 IU vitamin E setara dengan 0,67 mg (FDA, 2016)

4. Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil yang telah diperoleh adalah metode analisis alfa tokoferol asetat dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis telah memenuhi persyaratan validitas yang terdiri dari spesifisitas, linieritas, presisi, akurasi, LOD, LOQ dan rentang. Untuk penetapan kadar suplemen vitamin E telah memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan USP.

Daftar Pustaka

- FDA. (2016). Guidance for Industry: Converting Units of Measure for Folate, Niacin, and Vitamins A, D, and E on the Nutrition and Supplement Facts Labels. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-converting-units-measure-folate-niacin-and-vitamins-d-and-e-nutrition-and>
- Fithriyah, N. (2013). *Analisis α -Tokoferol (Vitamin E) pada Minyak Biji Kelor (Moringa Oleifera Lam.) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Skripsi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta: Jakarta.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Vol. 78). Bandung: Penerbit ITB.
- Harmita, H. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117-135. doi:<http://doi.org/10.7454/psr.v1i3.3375>
- ICH. (2021). Validation of Analytical Procedures Q2(R2). *European Medicines Agency*. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf
- Iddir, M., Brito, A., Dingo, G., Del Campo, S. S., Samouda, H., La Frano, M. R., & Bohn, T. (2020). Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. *Nutrients*, 12(6). doi:<https://doi.org/10.3390/nu12061562>
- Irawati, L. (2011). Validasi Metode Spektrofluorometri untuk Penentuan Alfa Tokoferol dalam Minyak Jagung. *Politeknik Negeri Ujung pandang, Makassar*.
- Jovic, T. H., Ali, S. R., Ibrahim, N., Jessop, Z. M., Tarassoli, S. P., Dobbs, T. D., Holford, P., Thornton, C. A., & Whitaker, I. S. (2020). Could vitamins help in the fight against COVID-19? *Nutrients*, 12(9), 2550. doi:<https://doi.org/10.3390/nu12092550>
- Kemenkes_RI. (2020). *Farmakope Indonesia, Edisi IV*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Lee, G. Y., & Han, S. N. (2018). The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*, 10. doi:<https://doi.org/10.3390/nu10111614>.
- Ng, M. H., & May, C. Y. (2012). Analisis Kromatografi Tokoferol dan Tokotrienol dalam Minyak Kelapa Sawit. *Jurnal Ilmu Kromatografi* 50(3), 283-286. doi:<https://doi.org/10.1093/chromsci/bms002>

- Prabowo, M. H., Wibowo, A., & Fauziah, L. (2012). Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Rifampicin Isoniazid-pirazinamid dalam Fixed Dose Combination dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(2). doi:<https://doi.org/10.20885/jif.vol9.iss2.art4>
- Shakoor, H., Feehan, J., Al Dhaheri, A. S., Ali, H. I., Platat, C., Ismail, L. C., Apostolopoulos, V., & Stojanovska, L. (2021). Immune-boosting Role of Vitamins D, C, E, zinc, Selenium and Omega-3 Fatty Acids: Could They Help Against COVID-19? *Maturitas*, 143, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.08.003>
- Sunaric, S., Lalic, j., & Spasic, A. (2017). Simultaneous Determination of Alpha-Tocopherol and Alpha-Tocopheryl Acetate in Dairy Products, Plant Milks and Health Supplements by Using SPE and HPLC Method. *Food Analytical Methods*, 10, 1-16. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-017-0943-x>
- Traber, M. G. (2007). Vitamin E Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Nutrients*, 27, 347-362.
- USP. (2018). The United States Pharmacopeia 44 - NF 36. U.S. *Pharmacopeial Convention Inc*, Rockville, p.6459-6460.