

## Validasi Metode Spektrofotometri UV Untuk Penetapan Kadar Kolkisin Dalam Infus Kembang Sungsang

Muhammad Muslich A, Isnaeni, Sudjarwo\*<sup>1,2</sup>

Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Campus C  
 Jl. Dr. Ir. H. Soekarno  
 \*E-mail: [sudjarwo0958@gmail.com](mailto:sudjarwo0958@gmail.com)

### Article History

Received: 12 March 2020; Received in Revision: 23 March 2020; Accepted: 1 April 2020

### ABSTRACT

Validation of colchicine analysis methods in herbal infusions has been carried out to facilitate quality control of raw materials or simplicia. The validation parameters of the method set include selectivity, linearity, precision, and accuracy, which are included in category I. In this study, the raw material was prepared from the leaves of *Gloriosa superba* Linn. infusion made. The results of the selectivity test with colchicine as a standard provide uptake at a chosen wavelength of 340.2 nm. Linearity test results show the equation  $y = 0.0303x + 0.0131$  with  $r = 0.9998$ .  $r$  Table for  $n = 6$ , ie 0.917 for  $p < 0.01$  and 0.811 for  $p = < 0.05$ , the value of  $V_{xo}$  is 1.15%. In the precision test, the coefficient of variation is 0.54% and the accuracy test gives an average recovery of  $92.81\% \pm 4.16\%$ . Determination of colchicine in the infusion preparation was carried out as many as three replications. The results showed that the content of colchicine in raw materials was  $0.3152\% \pm 1.99\%$ , while the colchicine content in herbal infusion preparations was  $0.483 \pm 4.47\%$ .

Keywords: validation of UV spectrophotometry method, colchicine, *Gloriosa superba*, herbal infusion

### ABSTRAK

Validasi metode analisis kolkisin dalam infus herbal telah dilakukan guna memfasilitasi kontrol kualitas bahan baku atau simplisia. Parameter validasi metode yang ditetapkan meliputi selektivitas, linieritas, presisi, dan akurasi, yang termasuk kategori I. Dalam penelitian ini, bahan baku disiapkan dari daun *Gloriosa superba* Linn. yang dibuat sediaan infus. Hasil uji selektivitas dengan kolkisin sebagai standar memberikan serapan pada panjang gelombang terpilih 340,2 nm. Hasil uji linearitas menunjukkan persamaan  $y = 0,0303x + 0,0131$  dengan  $r = 0,9998$ .  $r$  Tabel untuk  $n = 6$ , yaitu 0,917 untuk  $p < 0,01$  dan 0,811 untuk  $p = < 0,05$ , nilai  $V_{xo}$  adalah 1,15%. Pada uji presisi, hasil koefisien variasi adalah 0,54% dan uji akurasi memberikan perolehan kembali rata-rata  $92,81\% \pm 4,16\%$ . Penentuan kolkisin dalam sediaan infus dilakukan sebanyak tiga replikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan kolkisin dalam bahan baku  $0,3152\% \pm 1,99\%$ , sedangkan kandungan kolkisin dalam sediaan infus herbal  $0,483 \pm 4,47\%$ .

Kata kunci: validasi metode spektrofotometri UV, kolkisin, *Gloriosa superba*

### Pendahuluan :

Validasi metode merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Parameter analitik yang diperlukan untuk validasi metode ini bergantung pada tipe

prosedur analitik (Harmita, 2004). Validasi metode merupakan hal yang penting untuk dilakukan dikarenakan berhubungan dengan reproduibilitas metode yang dikembangkan sehingga memberikan hasil yang sama meskipun perbedaan pada personal, instrumen, prosedur dan tempat pengerjaan (Gandjar dan Rohman, 2010). Metode dalam validasi yang digunakan untuk pemeriksaan produk farmasetika

Cite this as: Muslich Validasi Metode Spektrofotometri UV Untuk Penetapan Kadar Kolkisin Dalam Infus Kembang Sungsang, 7(1), 7-13

This is an open access article under the CC BY-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori yaitu kategori I metode analitik untuk kuantitas komponen maupun substansi bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet). Kategori II metode analitik untuk menentukan campuran dalam substansi bahan baku atau komponen sisa. Metode ini termasuk perhitungan kembali secara kuantitatif dan batas tes. Pada kategori III untuk menentukan performa karakteristik (contoh: disolusi, pelepasan obat) (Harmita, 2004).

Salah satu metode analisis yang bisa digunakan untuk validasi metode adalah spektrofotometri UV. Serapan Spektrofotometri UV dapat terjadi jika terdapat ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur (yaitu dua ikatan rangkap atau lebih dalam suatu seri yang dipisahkan oleh ikatan tunggal). Serapan terjadi pada panjang gelombang yang lebih panjang dan dengan intensitas yang lebih besar. Sistem ikatan rangkap yang diperpanjang tersebut dikenal sebagai 'kromofor'. Kromofor paling umum yang ditentukan di dalam molekul obat adalah cincin benzena. Benzena tersebut memiliki pita serapan yang kuat pada 204 nm. Hal ini disebabkan oleh kesimetrisan benzena (Watson, 2005). Salah satu bahan aktif obat yang mempunyai cincin benzena adalah kolkisin. Kolkisin merupakan produk alami yang dapat diekstraksi dari tanaman dari keluarga lily yaitu tanaman *Gloriosa superba* Linn atau yang dikenal dengan nama kembang sunsang (Cocco et al., 2010).

Tanaman kembang sunsang merupakan tanaman herba dengan tinggi 1-2.5 meter dan mempunyai bunga (Steenis, 1997). Pada tanaman *Gloriosa superba* Linn yang terdapat di Sri Lanka mempunyai kandungan kolkisin tertinggi ada pada bagian perikarp yaitu 0.1%-0.25% lalu yang kedua dari biji dengan kandungan 0.15%-0.25% sedangkan pada daun tua 0.01%-0.05% dan pada daun muda 0.01%-0.06% (Arambewela et al., 1991). Sedangkan Isnawati 2006 dari Litbang Kesehatan memperoleh kadar kolkisin sebesar 0,44%. Walaupun bagian perikarp mempunyai banyak kandungan kolkisin tetapi bagian yang diambil dalam penelitian ini adalah daun, hal ini dikarenakan perikarp *Gloriosa superba* beracun sedangkan daun tidak (Isnawati, 2006).

Aneka produk olahan dari bahan baku tanaman ini belum ada dipasaran sehingga dipilih dalam bentuk seduhan dikarenakan mudah dalam penggunaannya. Selain itu, seduhan merupakan suatu cara yang sudah dikenal oleh masyarakat karena sangat praktis penanganannya. Kandungan senyawa di dalam seduhan sangat kompleks sehingga perlu dilakukan validasi metode spektrofotometri UV untuk penetapan kadar kolkisin dalam seduhan herbal kembang sunsang.

## Bahan dan Cara Kerja

### Bahan:

Kolkisin (Pharmaceutical grade, Shaanxi taiji Huaqing Technology Co. Ltd.), tanaman *Gloriosa superba* Linn bagian daun dari Kebun Raya Purwodadi Indonesia, Kloroform pa. (BDH), Aquadest.

### Cara Kerja :

#### Pembuatan Seduhan Herbal Kembang Sunsang

Pembuatan seduhan dimulai dari daun tanaman kembang sunsang (*Gloriosa superba*) yang dikeringkan di dalam ruangan sampai kering. Setelah kering dicacah kecil-kecil menjadi simplisia serbuk, sebanyak 0,158 gram kemudian dimasukkan wadah sachet. Simplisia (0,158 gram) tersebut dilarutkan dalam air mendidih 50 ml aduk sampai homogen lalu disaring menggunakan kertas saring Whatzman lalu masuk labu ukur 50ml dan ditambah aquadest sampai garis tanda.

#### Penetapan Kadar Air Daun Kembang Sunsang

Penetapan kadar air untuk daun kembang sunsang menggunakan metode gravimetri. Timbang serbuk daun sebanyak satu gram. Tara wadah kering, masukkan zat uji kedalam wadah dan timbang seksama wadah beserta isinya. Keringkan dalam oven pada suhu 105° selama lima jam, kemudian masuk eksikator selama satu jam dan timbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak satu jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-berturut tidak lebih dari 0,25% (Farmakope Indonesia IV, 1995).

#### Validasi Metode

##### Pemilihan panjang gelombang

Dibuat larutan baku kolkisin delapan ppm (dua ml standar kolkisin 40 ppm dalam labu ukur 10ml); dua ml larutan seduhan herbal kembang sunsang ; dua ml larutan seduhan herbal kembang sunsang yang ditambahkan dengan larutan standar kolkisin dua ml 400ppm. Sebagai blanko digunakan kloroform. Kemudian ketiga larutan tersebut diamati spektranya dengan menggunakan Spektrofotometer UV pada  $\lambda$  240-400 nm. Selanjutnya ditentukan panjang gelombang terpilih dengan cara terpilih.

##### Linieritas

Dibuat Larutan baku kerja dengan konsentrasi tiga ppm, enam ppm, sembilan ppm, 12 ppm 15 ppm dan 18 ppm

##### Presisi

Dipilih satu konsentrasi dari larutan yang dipakai untuk akurasi yaitu 12 ppm. Sebagai blanko digunakan kloroform. Larutan diamati absorbansinya sebanyak sepuluh kali pengamatan, kemudian dihitung absorbansi rata – rata, standar deviasi (SD), dan koefisien variasi (KV). Presisi dikatakan memenuhi syarat jika KV tidak lebih dari 2%.

### Akurasi

Ditimbang dengan seksama 50mg standart kolkisin kemudian dilarutkan dalam beaker glass 50ml dengan aquadest lalu masuk labu ukur 50ml didapatkan larutan baku induk 1000ppm. Dipipet 4ml 1000ppm lalu dilarutkan dalam labu ukur 10ml didapatkan larutan baku kerja 400ppm. Selanjutnya ditimbang 2,5 gram serbuk seduhan herbal kembang sunsang kemudian ditambahkan 100ml air mendidih serta disaring lalu dimasukkan labu ukur 100ml sampai garis tanda.

Dibuat larutan standar kolkisin dengan konsentrasi 1ml 400ppm, masing masing konsentrasi dari larutan standar kolkisin tersebut ditambah(adisi) seduhan herbal dengan volume meningkat (0,5ml; 1,0ml; 2,0ml; 3,0ml; 4,0ml), selanjutnya kedua larutan tersebut dimasukkan tabung reaksi 15ml dan ditambah 6ml kloroform. Kemudian diekstraksi selama tiga menit dan dipipet 1,0 ml ekstrak kloroform lalu ditambah kloroform dilabu ukur 10ml sampai garis tanda. Dibuat larutan yang sama untuk akurasi 80%, 100%, 120% serta masing-masing direplikasi 3 kali.

Selanjutnya masing-masing larutan diamati absorbannya menggunakan Spektrofotometer UV pada panjang gelombang terpilih dan cara terpilih. Dihitung % Recovery berdasarkan kadar yang didapat dibagi dengan kadar yang diketahui dikali 100%.

Kriteria yang diterima untuk persen recovery dari obat adalah 80 – 120% (APVMA, 2004).

e. Penetapan Kadar Kolkisin Dalam Larutan Serbuk Seduhan Herbal Kembang Sunsang dengan Metode Spektrofotometri UV

Dibuat larutan serbuk seduhan herbal kembang sunsang dengan volume 1,0 ml, masing masing dari larutan serbuk seduhan herbal kembang sunsang tersebut ditambah(adisi) larutan standar kolkisin dengan konsentrasi meningkat (0,5ml 400ppm; 1,0 ml 400ppm; 2,0ml 400ppm; 3,0ml 400ppm; 4,0ml 400ppm), selanjutnya

kedua larutan tersebut dimasukkan tabung reaksi 15,0 ml dan ditambah 6ml kloroform. Kemudian diekstraksi selama tiga menit dan fase kloroform dipipet 1,0 ml lalu ditambah kloroform dilabu ukur 10,0 ml sampai garis tanda. Untuk penetapan kadar masing-masing adisi diamati absorbannya menggunakan Spektrofotometer UV pada panjang gelombang terpilih dan cara terpilih. Kadar kolkisin dalam seduhan herbal kembang sunsang dapat dihitung berdasarkan kurva kalibrasi larutan standar kolkisin.

### Hasil Penelitian

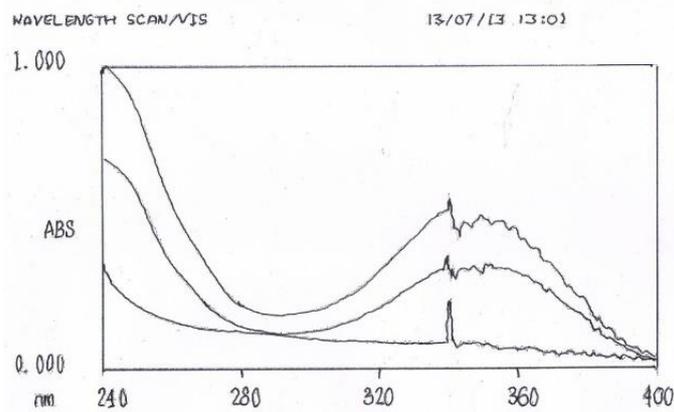
**Tabel 1. : Kadar Air Sampel Serbuk Seduhan herbal**

Krus	Kadar Air(%)
I	16, 56%
II	16, 06%
III	15, 70%
Rata-rata	16,11%
SD	0,4319
KV	2,68%

### Pemilihan panjang gelombang

Dari data spektra diatas, diketahui bahwa panjang

gelombang terpilih adalah 340,2 nm. Sehingga untuk pengamatan selanjutnya



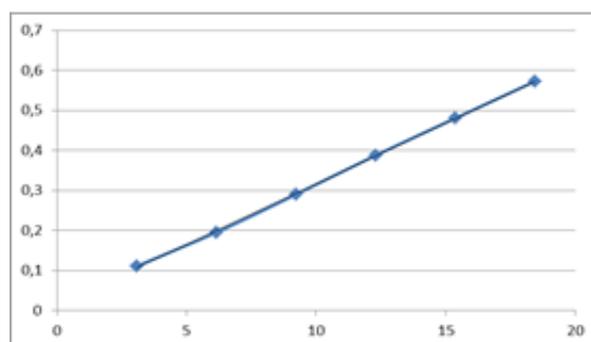
Gambar 1: Pemilihan panjang gelombang : Spektra Adisi Standar Kolkisin dengan Seduhan herbal (1), larutan standart kolkisin (2), Seduhan herbal (3).

Tabel 2 : Linieritas larutan kolkisin

Kadar (ppm)	Absorban Kolkisin	Persamaan Regresi
3,078	0,111	Y= 0,0303x+0,0131 r= 0,9998
6,156	0,195	
9,234	0,290	
12,312	0,388	
15,39	0,481	
18,468	0,573	

Dari hasil penelitian, diperoleh persamaan regresi  $Y = 0,0303x + 0,0131$  dengan koefisien korelasi  $r = 0,9998$  dimana lebih besar dari r table untuk  $(n=6)$  yaitu

0,917 untuk  $p < 0,01$  dan 0,811 untuk  $p < 0,05$  dengan harga  $V_{xo}$  sebesar 1,15%. Memenuhi persyaratan untuk  $V_{xo} \leq 5\%$ .



Gambar 2 : Linieritas larutan kolkisin

Tabel 3 : Akurasi

Akurasi	Replikasi	Berat Kolkisin diketahui (mg)	Berat Kolkisin yang dihitung (mg)	% recovery
80%	1	0,4088	0,3578	87,52
	2	0,4120	0,3678	89,27
	3	0,4040	0,3990	98,76
100%	1	0,5120	0,4811	93,96
	2	0,5220	0,4812	92,18
	3	0,5130	0,4965	96,78
120%	1	0,6216	0,5974	96,11
	2	0,6084	0,5571	91,57
	3	0,6156	0,5487	89,13
<b>Rata-rata</b>	92,81			
<b>SD</b>	3,86			
<b>KV</b>	4,16%			

Berdasarkan Perhitungan akurasi 80%, 100%, 120%

diperoleh % Recovery rata-rata sebesar  $92,81\% \pm 4,16\%$ .

Tabel 4 : Penetapan kadar kolkisin di dalam seduhan simplisia daun kembang sunsang

Replikasi	Berat Serbuk Seduhan (mg)	% Kadar Air	Kadar kolkisin yang diperoleh (mg)	% Kadar Kolkisin
1	2501,6	16,11%	7,7052	0,3080
2	2505,5	16,11%	7,9998	0,3193
3	2518,1	16,11%	8,0172	0,3184
Rata-rata	0,3152			
SD	$6,2804 \cdot 10^{-3}$			
KV	1,99 %			

Pada penetapan kadar kolkisin di dalam seduhan simplisia didapatkan kadar rata-rata 0,3152%  $\pm$  1,99%. Dari kadar ini, kemudian dikonversi kedalam

kandungan kolkisin sekali minum yaitu 0,5 mg sehingga didapatkan berat 0,158 gram.

Tabel 5 : Penetapan Kadar Kolkisin di dalam Seduhan herbal 50,0 ml

Replikasi	Berat Sediaan Seduhan (gram)	% Kadar Air	Kadar Kolkisin yang diperoleh (mg)
1	0,1588	16,11%	0,460
2	0,1586	16,11%	0,485
3	0,1581	16,11%	0,503
Rata-rata	0,483		
SD	0,0216		
KV	4,47%		

gelombang maksimum yaitu 350 nm (Arambewela et al., 1991). Selisih panjang gelombang dalam literatur berbeda dengan yang diperoleh, hal ini disebabkan dari matriks sampel yang berbeda. Disamping itu, hasil uji selektivitas pada penelitian ini menunjukkan bahwa matriks seduhan herbal tidak memberikan gangguan terhadap spektrum dari standart kolkisin.

Hasil ini ditunjukkan dengan spektra seduhan herbal yang diadisi kolkisin standart menunjukkan profil yang sama dengan spektrum standart kolkisin (Gambar 1).

Sedangkan pada uji Linieritas bertujuan untuk menunjukkan adanya hubungan yang linear antara konsentrasi larutan baku kerja kolkisin dengan absorbannya. Dari hasil penelitian, diperoleh persamaan regresi  $Y = 0,0303x + 0,0131$  dengan koefisien korelasi  $r = 0,9998$  dimana lebih besar dari  $r$  table untuk ( $n=6$ ) yaitu 0,917 untuk  $p < 0,01$  dan 0,811 untuk  $p < 0,05$  dengan harga  $V_{x0}$  sebesar 1,15%. Memenuhi persyaratan untuk  $V_{x0} \leq 5\%$ . Hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang dilakukan oleh Patial dan Verma, 2012 yang menghasilkan persamaan regresi  $y = 0,037x + 0,005$ . Bahwa hukum Lambert – Beer terpenuhi pada konsentrasi 6 – 22  $\mu\text{g/ml}$  untuk  $\lambda$  353,8 nm. Linearitas ditentukan pada konsentrasi 6 – 22  $\mu\text{g/ml}$  dengan koefisien korelasi 0,995. Serapan

antara 0,216 – 0,819 pada  $\lambda$  353,8 nm. Hal ini, menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang linier antara kadar kolkisin dengan absorbansi.

Berdasarkan hasil uji presisi untuk melihat ketelitian alat, yang dilakukan dengan menggunakan satu larutan yaitu 12ppm dengan diamati secara berulang. Hasil pembacaan absorbansi pada Spektrofotometer (Lambda EZ 201 Perkin Elmer) sangat baik, ditunjukkan oleh nilai koefisien variasi (KV) yaitu 0,5401% (persyaratan  $KV \leq 2\%$ ). Hasil ini sama dengan yang dilakukan Patial dan Verma 2012 bahwa presisi yang mereka lakukan memberikan nilai  $KV < 2\%$ .

Pada saat uji akurasi, sampel serbuk seduhan dipreparasi dengan cara mengekstraksi hal ini bermaksud untuk memisahkan antara kolkisin dengan matriks sampel. Uji akurasi dilakukan untuk memperoleh kedekatan hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Untuk mendokumentasikan akurasi, ICH merekomendasikan pengumpulan data dari 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Data harus dilaporkan sebagai peresentasi perolehan kembali (%Recovery) (Gandjar dan Rohman, 2007). Pada proses preparasi, standar kolkisin ditambahkan kepada sampel dengan berbagai konsentrasi.

Keakuratan metode harus dinilai dengan menggunakan minimal 9 penentuan dilakukan pada rentang minimal tiga kadar 80%, 100%, 120% dari konsentrasi target ( Yuwono M, Indrayanto G., 2005). Dari hasil uji akurasi 80%, 100%, dan 120% diperoleh % Recovery rata-rata  $92,81\% \pm 4,16\%$ . Sehingga % Recovery tersebut memenuhi persyaratan yaitu 80-120% untuk validasi metode. Penelitian lain dilaporkan bahwa (%) recovery antara  $97,66 - 99,75\%$  ( $K.V \leq 10\%$ ) (APVMA, 2004; Patial dan Verma., 2012). Perbedaan hasil ini dikarenakan proses metode yang digunakan berbeda dimana Patial dan Verma menggunakan pelarut buffer saline sedangkan penelitian ini menggunakan kloroform, dan proses ekstraksi yang belum sempurna. Metode yang telah dioptimasi dan divalidasi tersebut dapat diaplikasikan untuk menganalisis penetapan kadar kolkisin pada sediaan karena ke tiga parameter validasi metode terpenuhi.

Sebagai aplikasinya terlebih dahulu ditetapkan kadar kolkisin dalam serbuk seduhan yang nantinya akan dibuat menjadi seduhan herbal. Dari hasil yang diperoleh didapatkan kadar kolkisin dalam daun *Gloriosa superba* purwodadi sebesar  $0,3152\% \pm 1,9923\%$ . Hal ini berbeda dengan penelitian Arambewela tahun 1991 yang menemukan kadar kolkisin dalam daun tua sebesar 0,01-0,05% dan pada daun muda sebesar 0,01-0,06%. Selain itu kadar yang didapat oleh peneliti Isnawati dari Litbang Kesehatan 2006 juga berbeda yaitu 0,44%. Hal ini disebabkan oleh perbedaan tempat pengambilan tanaman *Gloriosa superba*, tanaman Arambewela berasal dari Sri Lanka sedangkan peneliti mengambil dari Purwodadi Kabupaten Pasuruan Jawa Timur sesuai dengan . Hal ini sesuai dengan faktor yang mempengaruhi komposisi kandungan kimia yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal meliputi genetik dan variasi fisiologi, sedangkan faktor eksternal meliputi iklim tanah (mencakup suhu, curah hujan, intensitas cahaya matahari), pH tanah, pemupukan, pengairan, pemberantasan penyakit (Pereira et al., 2006).

Pada penentuan kadar dalam seduhan herbal, dilakukan konversi kadar  $0,3152\%$  kedalam dosis sekali minum kolkisin yaitu 0,5 mg per hari (Sweetman, 2009), sehingga didapatkan berat 0,158 gram. Pada penentuan kadar kolkisin di dalam sediaan seduhan (50,0 ml) daun kembang sunsang sekali minum, didapatkan kadar rata-rata  $0,483 \text{ mg} \pm 4,47\%$ .

## Kesimpulan Dan Saran

### Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan bahwa metode Spektrofotometri UV yang telah dioptimasi dan divalidasi tersebut memenuhi persyaratan yang meliputi: selektivitas, linearitas, presisi dan akurasi.

Pada selektifitas didapatkan panjang gelombang terpilih 340,2 nm, pada uji linieritas dengan persamaan ini adalah  $Y = 0,0303x + 0,0131$ . Koefisien korelasi ( $r = 0,9998$ ) lebih besar dari  $r$  table untuk ( $n=6$ ) yaitu 0,917 untuk  $p < 0,01$  dan 0,811 untuk  $p < 0,05$  dan harga  $V_{xo}$  sebesar 1,15%. Pada uji ketelitian atau presisi dapat dinyatakan dengan koefisien variasi sebesar 0,54%, memenuhi persyaratan  $KV < 2\%$ . Hasil uji pada penelitian ini memberikan hasil uji akurasi (% Recovery rata-rata) yaitu  $92,81\% \pm 4,16\%$ . Memenuhi persyaratan akurasi untuk validasi metode 80 - 120%.

Pada aplikasi penetapan kadar kolkisin dalam larutan serbuk seduhan didapatkan kadar sebesar  $0,3152\% \pm 1,99\%$  dan kadar kolkisin dalam seduhan herbal kembang sunsang 50ml diperoleh sebesar  $0,483 \text{ mg} \pm 4,47\%$ .

## Saran

Diperlukan suatu standar operasional prosedur dalam pembuatan seduhan herbal kembang sunsang. Untuk penetapan kadar kolkisin dalam seduhan herbal dari *Gloriosa superba* dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

## Daftar Pustaka

- Abernethy, Darrell R., Braden, Larry L., Brater, D. Craig., Mars, Susan S de., Mauger, John W., William, Roger L., Hickey, Anthony J., Peter, Ganz., Tente, William., Yeoman, L., Garfinkle, Barry D., Foster, Thomas S., Allen, Loyd V., Shefter, Eli, and Popin, William F., 2007. The United States Pharmacopeia 30 The National Formulary 25. . Rockville : The United State Pharmacopeial Convention, Inc. p.1826
- Arambewela, Lakshmi S.R, Kumundini and Ratunga, J.1991. Studies an *Gloriosa superba* Grown in Sri Lanka. Ceylon Institute of Scientific and Individual Research. p.178.
- Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority (APVMA). 2004. Guidelines For The Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products. <http://www.apvma.gov.au>
- British Standard.2002. Method for Preparation of a liquor of tea for use in sensory tests. London: British Standards Institution. p.1
- Cocco, Giuseppe, Chu, David C.C., and Pandolfi, Stefano, 2010. Colchicine in clinical medicine. A guide for internists. European Journal of Internal Medicine. p.503-504.
- Departemen Kesehatan. 1995. Farmakope Indonesia IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dewoto, Hedi R. 2007. Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka.

- Majalah Kedokteran Indonesia. Vol.57, No.7, p.205-206.
- Gandjar, Ibnu Gholib., dan Rohman, Abdul, 2010. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. Hal 234-262.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use. 2005. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH.
- Isnawati, A., dan Arifin, K.M., 2006. Karakteristik Daun Kembang Sungsang (*Gloriosa superba*) dari aspek fisiko kimia. Media Litbang Kesehatan, XVI nomor 4, Hal. 8 – 14.
- Jain, A.P., and Suryavanshi, S., 2010. *Gloriosa superba* Linn – a pharmacological review. IJPRD/PUB/ARTI/VOV-2/ISSUE-8/OCT/004, p. 24 – 28.
- Jana, S., and Shekhawat, G.S., 2011. Critical review on medicinally potent plant species: *Gloriosa superba*. Fitoterapia 82, p. 293–301.
- KBBI online. 2013. Pengertian Seduh. Diakses dari [kbbi.web.id/seduh-2](http://kbbi.web.id/seduh-2), pada tanggal 20 September 2013.
- Mulja, M. dan Syahrani, A.1989. Aplikasi Analisis Spektrofotometri UV-Vis. Surabaya: Mephiso Grafika.
- Mulja, M., dan Suharman. 1995. Analisis Instrumental. Surabaya : Airlangga University Press.
- Narayana, B., Divya, N S. 2010. A New Method for Spectrophotometric Determination of Cholicoside. Journal of Scientific & Industrial Research. Vol. 69. p.368.
- Patil, A., and Verma, P., 2012. Development of UV Spectrophotometric method for estimation of cholicine in phosphate buffer saline pH 6,4. IRJP, 3 (2), p. 87 – 89.
- Pawar, B.M., Wayhal, V.P., Pawar, N.D., Agarwal, M.R., Shinde, P.B., Kamble, H.V., 2010. Anthelmintic activity of *Gloriosa superba* Linn (Liliaceae). International Journal of Pharm Tech Research CODEN (USA): IJPRIF ISSN: 0974-4304 Vol.2 No.2, p.1483-1487.
- Pereira, G.E, Gaudillere, J., Leeuwen, C., Hilbert, G., Maucourt, M, Deborde, C., Woing, A., Rolin, D. 2006. H-NMR metabolic profiling of wines from three cultivars, three soil types and two contrasting vintages. Congres International des terroirs viticoles 2006-Vith International teiroir congress 2006.
- Rajagopal, C and Kandhasamy, R., 2009. Genetic variability of kashappai kizhangu (*Gloriosa superba* L.) in Tamil Nadu assesed using morphological and biochemical traits. Tropical Agriculture 47 (1-2), p. 77-79.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipient sixth edition. London: Pharmaceutical Press.
- Putro Agus Harnowo. Baru 1% Jenis Tanaman di Indonesia yang Termanfaatkan. Diakses dari [http://health.detik.com/read/2012/06/12/143207/1939225/763/baru-1-jenis-tanaman-di-indonesia-yang-termanfaatkan?utm\\_source=topshare](http://health.detik.com/read/2012/06/12/143207/1939225/763/baru-1-jenis-tanaman-di-indonesia-yang-termanfaatkan?utm_source=topshare)
- Syarif, Amir, dan Ascobat, Purwastyastuti.,dkk.2007. Farmakologi dan Terapi Edisi 5.Jakarta: Departemen Farmakologi Setiorini, Santi, dan Handoyo. 2010. Analisa Kadar Klorida Pada Kantong Seduhan Herbal Serta Pengaruhnya Terhadap Mutu Teh.Surabaya: Prodi Kesehatan Lingkungan Madiun Jurusan Kesehatan Lingkungan Politeknik Kesehatan Departemen Kesehatan. Hal.165.
- Steenis, van Dr C.G.G.J.1997.FLORA Untuk Sekolah di Indonesia. Jakarta : PT Pradnya Paramita.
- Sweetman, S.C., 2009. Martindale. The Complete Drug Reference. Thirty-sixth edition. London: Pharmaceutical Press.
- The United State Pharmacopeial Convention. 2009. The United State Pharmacopeia Ed National Formulary 27, Rockville: The United State Pharmacopeial Convention, p. 733.
- Watson, D.G., 2005. Analisis Farmasi Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi, edisi 2. Diterjemahkan oleh Syarief, W. R. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hal 243
- Yuwono, Mochammad and Gunawan Indrayanto.2009. Validation of Chromatographic Method of Analysis. Elsevier Inc. Vol. 32. p.251.