

STUDI IN VITRO HUBUNGAN LOGARITMA KOEFISIEN PARTISI DENGAN IKATAN PROTEIN PLASMA DARI ANTIDIABET TURUNAN SULFONIL UREA SEBAGAI BAHAN PEMBELAJARAN MATA KULIAH FARMASI FISIK

Eka Deddy Irawan

Abstract. This paper shows that oral antidiabetic Sulfonil Ureic derivatives (The first generation: Chlorpropamide, and the second generation : Gliclazide, Glibenclamide & Glipizide) have logarithmic partition coefficient value increased. The increased value in logarithmic coefficient partition due to modification of chemical structure of such compounds. Such modification caused the polarity property of such compound increases, which in turn, increasing the logarithmic coefficient partition value. According to this paper that the chemical structure of antidiabet sulfonil ureic derivatives play important role in protein plasm bonding in drug. This article can be used as laboratory practice or studied material on Physical Pharmacy.

Keyword : In Vitro Study, Oral antidiabetic Sulfonil Ureic derivatives, logarithmic partition coefficient, protein plasm bonding.

PENDAHULUAN

Farmasi Fisik adalah bidang ilmu yang mempelajari persoalan yang berhubungan dengan fenomena fisika dan kimia terutama yang erat kaitannya dengan formulasi sediaan dan sistem dispersi. Untuk dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam terhadap fenomena fisika dan kimia yang terkait dengan formulasi sediaan dan sistem dispersi maka diperlukan praktek di laboratorium. Dewasa ini banyak sekali digunakan obat-obatan antidiabet, dari turunan Sulfonil Urea dan Biguanida. Dengan diketemukannya bahwa turunan Biguanida menimbulkan efek toksik maka para dokter cenderung lebih memilih obat-obatan turunan Sulfonil Urea dengan pertimbangan antara lain karena dianggap paling ampuh di dalam menurunkan kadar gula darah disamping terapi dengan insulin. (Siswandono & Soekarjo B 1995; Root & White 1956; Joslin 1960)

Seperti obat-obatan lain, maka turunan Sulfonil Urea akan menimbulkan aksi farmakologis yang diinginkan apabila obat dalam bentuk bebasnya dapat mencapai

tempat aksi obat. Pada tempat aksi inilah terjadi interaksi antara obat dengan reseptor sehingga timbul aksi farmakologis yang diinginkan. (Chien, Yie.,et.al,1975)

Tahapan sebelum dicapainya tempat aksi, maka obat harus menembus membran biologis terlebih dahulu. Dalam proses penembusan membran, sifat-sifat fisik dari obat yang bersangkutan sangatlah berpengaruh. Oleh karena itu, untuk dapat menimbulkan aksi farmakologis yang diinginkan, kelarutan dalam lemak atau logaritma koefisien partisi dari obat yang bersangkutan sangatlah memegang peranan.(Golstein, Avram et.al,1974)

Bahwa obat dalam perjalannya menuju tempat aksi, sebagian akan berikatan dengan protein plasma yang ada didalam darah. Akibatnya obat yang berikatan dengan protein plasma tidak akan dapat mencapai tempat aksi obat. Dengan demikian, baik logaritma koefisien partisi maupun ikatan obat dengan protein plasma akan mempengaruhi aksi farmakologis yang diinginkan.(Tan Hoan Tjay, Rahardja K,1986)

Perbedaan struktur pada turunan Sulfonil Urea diperkirakan akan menyebabkan adanya perbedaan lipofilitasnya yang selanjutnya akan mengakibatkan adanya perbedaan kemampuan penembusan terhadap membran biologis dan perbedaan kadarnya dalam darah. Obat-obat yang mempunyai nilai logaritma koefisien partisi besar, akan mudah menembus membran biologis sehingga jumlahnya di dalam darah juga besar. Karena jumlahnya dalam darah besar, maka jumlah obat yang terikat oleh protein plasma dalam hal ini albumin juga besar. Sedangkan untuk obat-obat yang mempunyai nilai logaritma koefisien partisi kecil, jumlahnya di dalam darah kecil sehingga jumlah obat yang terikat oleh albumin juga kecil.(Siswandono & Soekardjo B, 1995)

Dari fenomena di atas, dengan adanya peningkatan nilai log P, maka akan terjadi peningkatan kemampuan penembusan membran biologis. Diduga, ini tentunya diiringi pula dengan peningkatan ikatan obat dalam protein plasma. Dengan kata lain terdapat hubungan yang linier antara nilai log P dengan nilai ikatan protein plasma. Fenomena inilah yang akan diteliti dalam penelitian yang akan dilakukan.(Sardjoko,1993)

METODE PENELITIAN

Alat & Bahan

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini : Erlenmeyer, Gelas beker, Labu Ukur, Pipet Volume, Corong pisah, pH meter ' Fisher ', Spektrofotometer Dual Wave Length Double Beam ' Hitachi ' (Type 557), Neraca Analitis Sartorius 2457, Termostat ' Karl Kolb '. Adapun bahan yang dipakai : Klorpropamid Kualitas untuk farmasi (PT. Pfizer Indonesia), Glikazid kualitas untuk farmasi (PT. Darya Varia Laboratoria), Glibenklamid kualitas untuk farmasi (PT. Hoescht Pharma Indonesia), Glipizid kualitas untuk farmasi (Carlo Erba Farmitalia), Bovine Serum Albumin (Sigma), N-Oktanол pro analisis (E.Merck), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pro analisis (E.Merck), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pro analisis (E.Merck).

Prosedur Penelitian

1. Penentuan nilai logaritma koefisien partisi (log P)

Diawali dengan pembuatan larutan bufer fosfat pH 7,4 (Staunton, Edward,1963), dilanjutkan dengan penentuan panjang gelombang maksimum (Clarke E.G.C,1980) yaitu mencari panjang gelombang tertentu, yang pada panjang gelombang tersebut serapan zat dari turunan Sulfonil Urea ini mencapai maksimum pada bufer fosfat pH 7,4 kemudian dilakukan pembuatan kurva baku masing – masing zat turunan Sulfonil Urea pada larutan bufer fosfat pH 7,4 pada panjang gelombang maksimumnya. Adapun tahapan pembuatan kurva baku adalah pembuatan sebanyak lima macam konsentrasi dalam larutan bufer fosfat pH 7,4 yang diukur masing – masing serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV – Vis dari antidiabet turunan Sulfonil Urea pada panjang gelombang maksimumnya sehingga didapatkan kurva baku dari masing – masing zat tersebut. Langkah berikutnya dilakukan penentuan koefisien partisi n-oktanol - air pada pH 7,4 yaitu mencampur larutan zat turunan Sulfonil Urea dalam bufer dengan pelarut organik yang tidak dapat bercampur dengan air lalu digojok. Setelah kesetimbangan partisi (fase air dan fase oktanol mengalami kejenuhan, selama 15 - 20 menit) maka kadar dalam pelarut bufer ditentukan dengan spektrofotometer UV - Vis. Adapun tahapan yang dilalui untuk mendapatkan nilai logaritma koefisien partisi (log P) dari masing – masing antidiabet turunan Sulfonil Urea adalah dibuat kadar zat dalam pelarut n –oktanol – air pada pH 7,4 sebesar 10 bpg, digojok selama 15 – 20

menit, kemudian diambil fase airnya dan diukur serapannya. Dari hasil pengukuran serapan tersebut dimasukkan kedalam persamaan kurva baku masing – masing zat sehingga didapatkan kadar zat dalam fase air, kemudian untuk menghitung kadar zat dalam fase n- oktanol dengan cara kadar 10 bpj tadi dikurangi dengan kadar zat dalam fase air. Setelah itu masing – masing kadar dalam fase n- oktanol dibandingkan dengan kadar dalam fase air sehingga didapatkan nilai P (koefisien partisi n –oktanol - air), lalu masing – masing nilai dilog-kan didapatkan nilai log P. Cara demikian dilakukan pada masing – masing zat sebanyak lima kali replikasi kemudian didapatkan nilai rerata log P dari masing – masing zat.

2. Penentuan persentase ikatan protein plasma

Diawali dengan pembuatan larutan n –oktanol pada pH 7,4 dilanjutkan dengan penentuan panjang gelombang maksimum yaitu mencari panjang gelombang tertentu yang pada panjang gelombang tersebut serapan zat turunan SulfonilUrea mencapai maksimum pada larutan n –oktanol pH 7,4 kemudian dilakukan pembuatan kurva baku masing – masing zat pada larutan n –oktanol pH 7,4 (Steinhard, 1969). Adapun tahapan pembuatan kurva baku adalah pembuatan sebanyak lima macam konsentrasi yang diukur masing – masing serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV – Vis dari zat turunan Sulfonil Urea pada panjang gelombang maksimumnya sehingga didapatkan kurva baku masing – masing zat. Langkah berikutnya baru dilakukan penentuan persentase ikatan protein plasma dari masing – masing zat turunan Sulfonil Urea yaitu dengan mencampur antara larutan zat dalam protein plasma dengan pelarut organik (n –oktanol). Disini kadar zat bebas (yang tidak terikat dengan protein plasma) akan mengalami kesetimbangan partisi dengan n-oktanol (Garret & Edward et.al., 1977). Adapun tahapan yang dilalui untuk mendapatkan nilai persentase ikatan protein plasma adalah kadar mula – mula larutan zat sebelum dicampur dengan protein plasma dibuat sebesar 100 bpj kemudian ditambahkan protein plasma (albumin) sebanyak 5 ml, lalu masing – masing diukur serapannya dengan spektrofotometer UV – Vis, kadar obat yang bebas dalam protein plasma diperoleh dari hasil serapan yang dimasukkan dalam persamaan kurva baku. Sedangkan kadar obat yang terikat protein plasma dihitung dari kadar obat setelah dicampur dengan protein plasma dikurangi dengan kadar obat yang bebas dalam protein plasma. Perhitungan persentase ikatan protein plasma adalah kadar obat yang terikat protein plasma dibandingkan dengan kadar obat setelah dicampur

dengan protein plasma x 100 %. Cara demikian pada masing – masing zat dilakukan sebanyak lima kali replikasi kemudian didapatkan nilai rerata dari persentase ikatan protein plasma dari masing – masing zat.

Analisis Data

Dari hasil pengamatan percobaan didapatkan dua variabel :

Variabel X : nilai logaritma koefisien partisi dari antidiabet turunan Sulfonil Urea (Klorpropamid, Glikasid, Glipizid, Glibenklamid).

Variabel Y : nilai persentase ikatan protein plasma dari antidiabet turunan Sulfonil Urea (Klorpropamid, Glikasid, Glipizid, Glibenklamid).

Ditentukan hipotesis H_0 = tidak ada korelasi linier antara variabel X dan Y

H_1 = ada korelasi linier antara variabel X dan Y

Bila F hitung > F tabel (pada $\alpha = 0,05$ dan $df = 2$) maka H_0 ditolak, berarti ada korelasi antara variabel X dan Y. Sebaliknya bila F hitung lebih kecil dari F tabel, H_0 diterima, berarti tidak ada korelasi linier antara variabel X dan Y. Untuk mengetahui perkiraan kesalahan standar (Standard Estimation of Error) harga variabel Y terhadap variabel X dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$S_{yx} = \frac{(\sum y - \sum yc)^2}{n - 2} \quad (\text{Daniel W.W, 1984})$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

1. Penentuan nilai logaritma koefisien partisi

Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum dari masing – masing antidiabet turunan Sulfonil Urea pada larutan bufer fosfat pH 7,4 jenuh oktanol yaitu Klorpropamid 230 nm, Glipizid 222 nm, Glikasid 225 nm dan Glibenklamid 206 nm, maka dilanjutkan dengan pembuatan kurva baku dari masing – masing antidiabet turunan Sulfonil Urea sebanyak lima macam konsentrasi dalam larutan bufer fosfat pH 7,4 kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang maksimumnya. Langkah berikutnya baru dilakukan penentuan

logaritma koefisien partisi n –oktanol air pada pH 7,4 yaitu mencampur larutan zat turunan Sulfonil Urea dalam pelarut bufer dengan pelarut organik (n –oktanol) yang tidak dapat bercampur dengan air lalu digojok selama 15 – 20 menit, kemudian kadar zat dalam pelarut bufer ditentukan dengan spektrofotometer UV – Vis. Adapun tahapannya masing – masing zat turunan Sulfonil Urea dibuat kadar dalam pelarut n – oktanol – air sebesar 10 bpj kemudian digojok selama 15 – 20 menit, diambil fase airnya dan diukur serapannya masing – masing. Hasil serapan tadi dimasukkan dalam kurva bakunya sehingga didapatkan kadar zat dalam fase air, kemudian untuk menghitung kadar zat dalam fase n -oktanol adalah kadar zat awal 10 bpj dikurangi dengan kadar zat dalam fase air. Setelah itu masing – masing kadar zat dalam fase n - oktanol dibandingkan dengan kadar zat dalam fase air sehingga didapatkan nilai P (koefisien partisi n –oktanol - air), lalu masing – masing nilai di log –kan didapatkan nilai log P. Langkah diatas untuk masing – masing zat turunan Sulfonil Urea dilakukan lima kali replikasi, kemudian didapat nilai rerata logaritma koefisien partisi (log P) dari masing – masing zat.

Adapun hasil dari penentuan nilai logaritma koefisien partisi dari antidiabet turunan Sulfonil Urea dalam sistem n-oktanol bufer fosfat pH 7,4 dengan metode spektrofotometri uv-vis adalah Klorpropamid $-0,32958 \pm 0,0129$, Glipizid $0,27016 \pm 0,0076$, Glikazid $-0,78228 \pm 0,0961$, Glibenklamid $-0,0614 \pm 0,0110$.

2. Penentuan ikatan protein plasma

Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum masing – masing anti diabet turunan Sulfonil Urea dalam larutan n –oktanol pH 7,4 yaitu Klorpropamid 233 nm, Glipizid 226 nm, Glikazid 228 nm dan Glibenklamid 256 nm, maka dilanjutkan dengan pembuatan kurva baku dari masing – masing antidiabet turunan Sulfonil Urea sebanyak lima macam konsentrasi dalam larutan n –oktanol pH 7,4 dengan menggunakan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang maksimumnya. Langkah berikutnya baru dilakukan penentuan nilai persentase ikatan protein plasma dari masing – masing zat turunan Sulfonil Urea yaitu dengan mencampur antara larutan zat dalam protein plasma dengan pelarut organik (n –oktanol). Disini kadar zat yang bebas (yang tidak terikat protein plasma) akan mengalami keimbangan partisi dengan n- oktanol (Garret, Edward et.al.,1977). Adapun tahapannya kadar mula – mula larutan zat

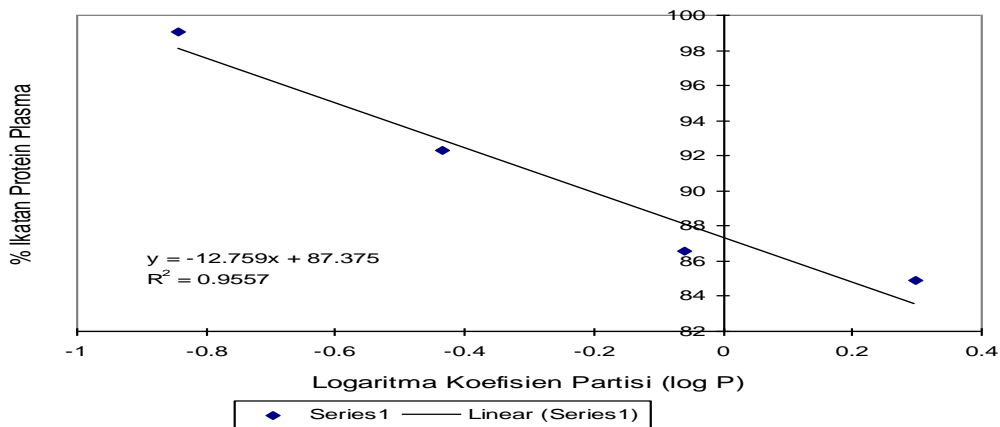
sebelum dicampur protein plasma dibuat sebesar 100 bpj, kemudian ditambahkan protein plasma (albumin) sebanyak 5 ml, lalu masing – masing diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV – Vis. Dari hasil serapan diperoleh kadar obat yang bebas dalam protein plasma yang dimasukkan dalam persamaan kurva baku masing – masing zat, sedangkan kadar obat yang terikat protein plasma diperoleh dari kadar obat setelah dicampur protein plasma dikurangi dengan kadar obat yang bebas dalam protein plasma. Perhitungan persentase ikatan protein plasma adalah kadar obat yang terikat protein plasma dibandingkan dengan kadar obat setelah dicampur protein plasma $\times 100 \%$. Langkah diatas untuk masing – masing zat turunan Sulfonil Urea dilakukan sebanyak lima kali replikasi, kemudian didapatkan nilai rerata persentase ikatan protein plasma dari masing – masing zat.

Adapun hasil dari penentuan ikatan protein plasma dari antidiabet turunan Sulfonil Urea dalam larutan n-oktanol pH 7,4 adalah Klorpropamid $92,286618 \pm 0,1390$, Glipizid $84,87524 \pm 0,2538$, Glikazid $99,02770 \pm 0,4328$, Glibenklamid $85,79952 \pm 0,4241$.

Tabel 1: Nilai rerata logaritma koefisien partisi (Log P) dan % ikatan protein plasma pada pH 7,4 dari antidiabet turunan Sulfonil Urea.

	Z a t	Log P \pm SD	% Ikatan Protein Plasma \pm SD
1.	Klorpropamid	$-0,32958 \pm 0,0129$	$84,87524 \pm 0,1390$
2.	Glipizid	$0,27016 \pm 0,0076$	$86,56220 \pm 0,2538$
3.	Glikazid	$-0,78228 \pm 0,0961$	$92,28618 \pm 0,4328$
4.	Glibenklamid	$-0,0614 \pm 0,0110$	$99,02770 \pm 0,2426$

Hubungan antara nilai logaritma koefisien partisi (Log P) dari Klorpropamid, Glipizid, Glikazid dan Glibenklamid dengan % ikatan protein plasma ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1:

Kurva Hubungan antara Nilai Logaritma Koefisien Partisi (Log P) dari Glipizid, Glibenklamid, Klorpropamid dan Glikazid

Dari hasil-hasil di atas maka didapat kesimpulan nilai logaritma koefisien partisi yang meningkat maka % ikatan protein plasma dari antidiabet turunan Sulfonil Urea semakin menurun. Fenomena ini menunjukkan bahwa kemungkinan protein yang ada di dalam darah terbatas (protein yang dimaksud adalah albumin), sehingga senyawa yang memiliki nilai logaritma koefisien yang lebih besar dari senyawa yang lainnya diikat oleh protein terbatas tadi, akibatnya ada senyawa yang tidak diikat oleh protein tadi, dengan demikian muncul fenomena prosentase ikatan protein plasma yang semakin menurun tadi dengan semakin meningkatnya nilai logaritma koefisien partisi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa antidiabet oral turunan Sulfonil Urea (Glikazid, Klorpropamid, Glibenklamid dan Glipizid) mempunyai nilai logaritma koefisien partisi yang semakin meningkat. Peningkatan nilai logaritma koefisien partisi tersebut disebabkan modifikasi dari rumus bangun turunan Sulfonil Urea yang bersangkutan. Modifikasi struktur molekul ini menyebabkan sifat kepolaritasan (kelarutan dalam pelarut lemak) dari turunan Sulfonil Urea yang bersangkutan meningkat. Dari hasil penelitian yang dilakukan ternyata struktur kimia obat turunan Sulfonil Urea lebih berperan dalam menentukan besarnya ikatan protein plasma.

Metode yang digunakan untuk penentuan ikatan protein plasma adalah keseimbangan partisi cairan-cairan. Pemilihan metode ini didasarkan atas pertimbangan bahwa pada metode ini memiliki kelebihan – kelebihan seperti, yaitu : tidak dibutuhkan

jumlah protein yang besar, tidak adanya pengaruh obat yang sebagian terserap dalam membrane serta pelaksanaannya tidak memakan waktu yang lama dan perlengkapannya mudah diperoleh dalam waktu relatif singkat, juga tidak terdapat masalah perubahan kadar protein plasma. Hal yang perlu diperhatikan dalam metode keseimbangan partisi cairan – cairan ini adalah pengadukan protein plasma dengan pelarut organik (n-oktanol) jangan dilakukan penggojogkan yang terlalu kuat sehingga protein plasma tidak mengalami denaturasi.

Untuk mendapatkan hubungan antara nilai logaritma koefisien partisi dari Klorpropamid, Glipizid, Glikazid dan Glibenklamid dengan ikatan protein plasmanya dilakukan analisis regresi dengan derajat kepercayaan 5%. Hasil yang didapatkan adalah ada korelasi linier negatif antara nilai logaritma koefisien partisi dari Klorpropamid, Glipizid, Glikazid dan Glibenklamid dengan ikatan protein plasma (Gambar 1), dengan persamaan garis $Y = -12,7511 X + 87,3745$ ($n = 4$; $S_{Y/X} = 1,7342$; $r^2 = 0,9777$; $F = 38,8650$).

Berdasarkan uji F pada derajat kepercayaan 5%, didapatkan persamaan garis $Y = -12,7511 X + 87,3745$ cukup representatif untuk menunjukkan hubungan linier negatif antara variabel nilai logaritma koefisien partisi (Log P) dengan variabel protein plasma dari antidiabet turunan sulfonil urea.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa :

1. Nilai logaritma koefisien partisi dalam sistem oktanol-bufer fosfat pH 7,4 dari Glipizid $0,29882 \pm 0,0196$, Glibenklamid $-0,0614 \pm 0,0110$, Klorpropamid $-0,4328 \pm 0,0097$ dan Glikazid $-0,84394 \pm 0,0502$.
2. Persentase ikatan protein plasma dalam larutan oktanol pH 7,4 dari Glipizid $84,87524 \pm 0,1390$, Glibenklamid $86,5622 \pm 0,2538$, Klorpropamid $92,28618 \pm 0,4328$, Glikazid $99,02770 \pm 0,2426$.
3. Ada korelasi linier antara nilai logaritma koefisien partisi (Log P) dengan % ikatan protein plasma dari Glipizid, Glibenklamid, Klorpropamid dan Glikazid dengan persamaan garis :

$$Y = -12,7511 X + 87,3745$$

($n = 4$; $S_{Y/X} = 1,7342$; $r = 0,9777$; $F = 38,8650$).

4. Peningkatan nilai logaritma koefisien partisi diikuti oleh penurunan persentase ikatan protein plasma dari antidiabet turunan Sulfonil Urea. Hal ini disebabkan karena protein yang ada didalam darah terbatas (protein yang dimaksud adalah albumin), sehingga senyawa obat yang memiliki nilai logaritma koefisien partisi yang lebih besar dari senyawa obat yang lainnya diikat oleh protein plasma yang terbatas tadi, akibatnya ada senyawa yang tidak diikat oleh protein plasma tadi, sehingga muncul fenomena dengan semakin meningkatnya nilai logaritma koefisien partisi maka persentase ikatan protein plasma semakin menurun.
5. Studi in vitro hubungan logaritma koefisien partisi dengan ikatan protein plasma dari anti diabet turunan sulfonil urea dapat digunakan sebagai bahan ajar dalam mata kuliah Farmasi Fisik.

DAFTAR PUSTAKA

- Chien, W.Yie., et.al., *Linear Relationship between Plasma Binding and Lipophilicity of Disopyramide Derivate*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 64 hal 961-966, 1975.
- Clarke, E.G.C., *Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press. 17 Bloomsburysquare W.C.I.London, hal 552-553 ; 586-587, 803, 1980.
- Daniel, W.W., *Biostatistic : A Foundation Of Analysis In The Health* , 2nd edition. New York : John Wiley and Sons, hal. 254-277, 1984.
- Elliot P. Joslin, *Diabetic Manual*, Chapter III Diabetes, Insulin and Oral Drug, Lea and Febiger , Philadelphia, Tenth Edition, hal. 39-41, 1960.
- Farmakope Indonesia Edisi Ketiga*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 159-160, 610-611, 1979.
- Garret, Edward R et.al., *Drug Fate and Metabolism vol I*, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, hal 188 – 227, 1977
- Goldstein, Avram., et al, *Principles of Drug Action, The Basic of Pharmacology*, 2nd edition, John Wiley and Sons. New York. London. Sydney. Toronto, hal. 42-52, 158-164, 1974.
- Howard F. Root, Priscilla White, *Diabetes Mellitus Handbook for Physicians* Chapter VII Oral Treatment of Diabetes With Sulphonamides, Landsberger Medical Books, Inc , New York, hal. 114-115, 1956.

Sardjoko, *Rancangan Obat, Cetakan pertama*, Gajah Mada University Press. Yogyakarta hal. 159, 1993.

Siswandono, Soekardjo B., *Kimia Medisinal*, Cetakan Pertama, Airlangga University Press, hal 709-713, 1995..

Staunton, Edward., *Text Book of Biophysical Chemistry*, 3th edition, The Macmillan Company, New York, hal. 98 - 110, 1963.

Steinhardt, Jacinto., et al, *Multiple Equilibrium in Protein*, Vol II, Academic Press. New York and London, hal. 34 - 65, 1969.

Tan Hoan Tjay, Rahardja K, *Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*, Bab 40 Insulin dan Antidiabetika Oral, Kimia Farma, Jakarta, hal. 567-583, 1986.