

# **ANALISIS AKTIVITAS PERLINDUNGAN SINAR UV SECARA *IN VITRO* DAN *IN VIVO* DARI BEBERAPA SENYAWA ESTER SINAMAT PRODUK REAKSI KONDENSASI BENZALDEHIDA TERSUBSTITUSI DAN ALKIL ASETAT**

**Iqmal Tahir, Jumina, Ike Yuliasuti**

*Jurusan Kimia, Fakultas MIPA- UGM*

*Sekip Utara Yogyakarta 55281*

**Mustofa**

*Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran - UGM*

*Sekip Utara Yogyakarta 55281*

*Telah dilakukan analisis perlindungan sinar UV secara *in vitro* dan *in vivo* terhadap beberapa senyawa ester sinamat. Senyawa ester sinamat yang diuji adalah (1) 2,4-dimetoksi heksil sinamat; (2) 3,4-dimetoksi heksil sinamat; (3) 3,4,5-trimetoksi heksil sinamat dan (4) 3,4-dimetoksi amil sinamat yang merupakan hasil sintesis dari benzaldehida tersubstitusi dan alkil asetat melalui kondensasi Claisen. Analisis perlindungan sinar UV secara *in vitro* dilakukan berdasarkan pengukuran panjang gelombang UV menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis, sedangkan pada analisis secara *in vivo* dipilih metoda uji potensi inflamatori senyawa dengan sampel hewan marmut (*Cavia cobayo*). Sebagai kontrol positif adalah tabir surya merk Rossolare yang dioleskan pada kulit marmut sedangkan kontrol negatif adalah marmut yang tidak diberi tabir surya. Sebagai sumber sinar UV digunakan lampu UV (Philips, 15 Watt).*

*Hasil analisis secara *in vitro* menunjukkan bahwa kelima senyawa relatif cukup baik sebagai penyerap sinar UV dengan perlindungan SPF maksimum pada konsentrasi berkisar antara 9 – 50 µg/mL. Analisis secara *in vivo* menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut relatif baik untuk melindungi kulit hewan uji dari efek terjadinya eritema akibat sinar UV yang ditunjukkan dengan skor kurang dari 1,9.*

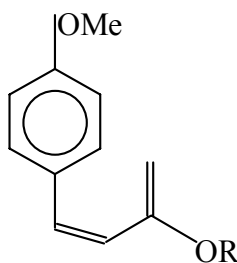
## **PENDAHULUAN**

Indonesia adalah negara yang terletak di daerah tropis dengan paparan sinar matahari sepanjang musim. Sebagian penduduknya bekerja di luar ruangan sehingga mendapat banyak paparan sinar matahari bahkan pada saat matahari sedang terik. Radiasi sinar matahari dapat mempengaruhi kesehatan kulit semua individu. Untuk mencegah efek buruk pajanan sinar matahari dapat dilakukan dengan cara menghindari pajanan berlebihan sinar surya, yaitu tidak berada di luar rumah pada jam 10:00-16:00, memakai pelindung fisik seperti pakaian tertutup, payung, caping dan memakai tabir surya topikal apabila memang kegiatan mengharuskan berada di bawah terik matahari (Perwitasari, dkk, 1999).

Dalam American Cancer Society (2001) sinar surya yang sampai di permukaan bumi dan mempunyai dampak terhadap kulit dibedakan menjadi sinar ultraviolet A atau

UV-A ( $\lambda$  320-400 nm), sinar UV-B ( $\lambda$  290-320 nm) dan sinar UV-C ( $\lambda$  200-290 nm) . Menurut Satiadarma (1986) sebenarnya sinar UV hanya merupakan sebagian kecil saja dari spektrum sinar matahari namun sinar ini paling berbahaya bagi kulit karena reaksi-reaksi yang ditimbulkannya berpengaruh buruk terhadap kulit manusia baik berupa perubahan-perubahan akut seperti eritema, pigmentasi dan fotosensitivitas, maupun efek jangka panjang berupa penuaan dini dan keganasan kulit. Seseorang dapat terkena paparan sinar UV-C dari lampu-lampu buatan dan akibatnya adalah kemerahan kulit, peradangan mata dan merangsang pigmentasi. Sinar UV-B sering disebut sebagai sinar *sunburn spectrum* dan juga paling efektif menyebabkan pigmentasi. Sinar UV-A biasanya hanya menyebabkan pencoklatan walaupun dapat juga menimbulkan *sunburn* namun lebih lemah dibandingkan dengan UV-B. Meskipun demikian efek kumulatif jangka panjang sinar UV-A sama dengan sinar UV-B karena intensitas sinar UV-A yang sampai ke bumi kira-kira 10 kali UV-B. Efek buruk sinar UV dipengaruhi oleh faktor individu, frekuensi, lama pajanan serta intensitas radiasi sinar UV

Berdasarkan struktur kimianya, ada dua bagian pada senyawa *p*-metoksi oktil sinamat yang dimungkinkan berperan penting yaitu bagian rantai alkil dan bagian rantai benzil. Berdasarkan struktur kimia senyawa tersebut maka terdapat bagian benzena aromatis dan sisi alkil yang bersifat relatif non polar. Efek perlindungan sinar UV dari senyawa diakibatkan bagian cincin benzena, sedangkan bagian sisi alkil digunakan untuk kontribusi sifat non polar senyawa yang berakibat senyawa tak larut dalam air (Tahir, dkk, 2000). Salah satu contoh senyawa tabir surya yang saat ini banyak digunakan adalah senyawa *p*-metoksi oktil sinamat yang merupakan turunan dari ester sinamat. Berdasarkan struktur kimia senyawa tersebut, maka pengembangan senyawa-senyawa turunannya dapat dilakukan untuk mencari senyawa lain yang lebih efektif dan jika mungkin disintesis dari bahan-bahan alam yang banyak terdapat di Indonesia.



**Gambar 1** Senyawa *p*-metoksi alkil sinamat

Pengukuran dan pengujian aktivitas senyawa-senyawa tabir surya dapat dilakukan dengan banyak cara yakni pengujian secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian aktivitas serapan sinar UV secara *in vitro* dapat dilakukan dengan teknik spektroskopi UV yang diukur pada rentang panjang gelombang sinar UV (200-400 nm). Metoda yang digunakan adalah seperti yang digunakan oleh Walters dkk (1997). Pengukuran lain yang langsung diujikan pada sel biologis adalah teknik analisis secara *in vivo*. Teknik ini dapat dilakukan dengan berbagai macam cara dan salah satunya adalah dengan pengamatan eritema akibat terkena paparan sinar UV dan dibandingkan dengan suatu kontrol. Eritema merupakan salah satu tanda terjadinya proses inflamasi akibat pajanan sinar tersebut dan terjadi apabila volume darah dalam pembuluh darah dermis meningkat hingga 38% di atas volume normal.

Seperti telah disebutkan di atas bahwa senyawa tabir surya yang banyak digunakan dalam industri kosmetika adalah senyawa turunan alkil sinamat. Tahir dkk (2000) mensintesis 6 senyawa turunan sinamat dengan rantai isoamil. Penelitian tersebut dilakukan dengan melakukan reaksi kondensasi Claisen menggunakan bahan turunan benzaldehida dan isoamil asetat. Pada penelitian ini dilakukan sintesis terhadap 4 senyawa ester sinamat baru dari benzaldehida tersubstitusi dengan alkil asetat melalui kondensasi Claisen yang sebelumnya telah diprediksi aktivitasnya berdasarkan *Quantitative Structure Analysis Relationship* (QSAR) dan prediksi tabir surya dengan metode semi empirik AM1 dan ZINDO/s. Dari hasil analisis struktur dan kemurnian senyawasenyawa tersebut relatif sudah cukup baik. Identifikasi struktur produk ester sinamat telah diketahui dengan menggunakan teknik-teknik GC-MS, spektrofotometri FT-IR dan <sup>1</sup>H-NMR. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas senyawa hasil sintesis secara *in vitro* dan *in vivo*. Analisis ini perlu dilakukan mengingat kebanyakan analisis terhadap senyawa-senyawa tabir surya hanya dilakukan secara *in vitro* atau *in vivo* saja. Dengan analisis kedua metode ini diharapkan diperoleh gambaran aktivitas senyawa sebagai penyerap sinar UV secara lebih lengkap.

Tujuan dari penelitian ini adalah dapat menguji aktivitas penyerapan sinar UV dari senyawa-senyawa turunan ester sinamat produk kondensasi Claissen. Pengujian dilakukan dengan teknik analisis *in vitro* menggunakan spektrofotometer UV dan analisis

*in vivo* dengan jalan pengukuran perubahan eritema pada sel kulit marmut (*Cavia cobaya*).

## **METODE PENELITIAN**

### **Bahan**

1. Senyawa 3,4-dimetoksi amil sinamat
2. Senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat
3. Senyawa 3,4,5-trimetoksi heksil sinamat
4. Senyawa 2,4-dimetoksi heksil sinamat
5. etanol
6. Isoniazid
7. Bahan tabir surya Rossolare
8. Marmut (*Cavia cobaya*) yang diperoleh dari UPT – Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Hewan UGM, dengan berat 250-300 g/ekor sejumlah 45 ekor.

### **Alat**

1. Spektrofotometer UV-Vis (UV, Milton Roy -Spectronic 3000)
2. Neraca elektrik dengan tingkat kepekaan sampai mgram
3. Kuvet
4. Lampu UV ( Philips,15 Watt)
5. Gunting dan alat pencukur bulu marmut
6. Box tempat pemejanaan hewan uji

### **Prosedur Penelitian**

#### *1. Analisis senyawa secara in vitro*

Untuk setiap senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat hasil sintesis dilarutkan dalam etanol dengan konsentrasi 2 µg/mL hingga 50 µg/mL kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang optimum. Selanjutnya dihitung nilai log SPF yang merupakan nilai absorbansi (serapan) dan kemudian ditentukan nilai SPF serta jenis proteksi tabir surya dari senyawa-senyawa alkil sinamat tersebut. Nilai SPF diukur berdasarkan nilai serapan senyawa mengikuti persamaan Walters (1997) yaitu  $SPF = -\log A$ . Jenis proteksi serapan ditentukan berdasarkan kriteria yang memberikan SPF maksimum yakni pada nilai antara 8-12.

## 2. Analisis senyawa secara *in vivo*

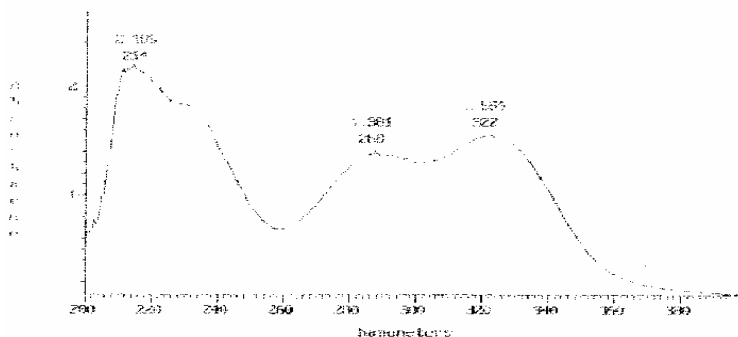
Metoda yang dipilih adalah uji potensi anti inflamasi senyawa yang dilakukan dengan mengamati efek terjadinya eritema pada kulit hewan uji yang disinari sinar UV (Thompson, 1990). Marmut dibagi dalam 3 kelompok yaitu kontrol positif, kontrol negatif dan marmut uji. Marmut sebagai kontrol negatif adalah marmut yang diberi isoniazid secara oral dosis 30 mg/mL dan dibiarkan  $\pm$  1 jam. Marmut sebagai kontrol positif adalah marmut yang diberi senyawa kontrol (Rossolare) pada 3 dosis yakni 0,5, 2,0 dan 3,5 mg/cm<sup>2</sup> dan dibiarkan  $\pm$  1 jam. Setelah bulu bagian punggung dicukur kemudian ditutup kain yang telah memiliki 6 lubang dan pada lubang tersebut diteteskan bahan uji. Bahan dibiarkan kontak  $\pm$  1 jam kemudian dipajan pada lampu UV selama 24 jam. Pengamatan dilakukan setelah 1 jam dari pajanan. Skor eritema yang digunakan adalah 0-4 yang menunjukkan tidak ada kemerahan (skor = 0) samapi merah menyala dengan perluasan daerah (skor = 4).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

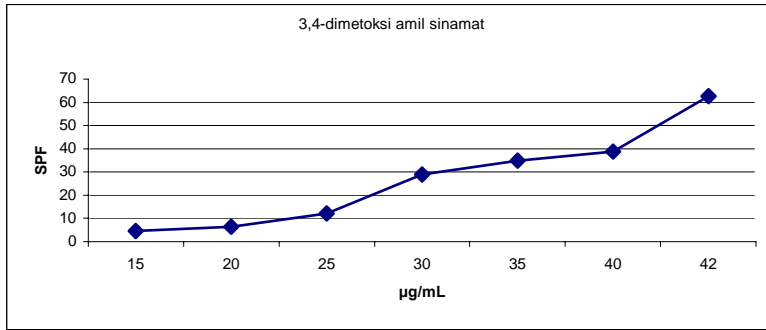
### Analisis Senyawa Secara *In Vitro*

Penentuan absorbansi terhadap deret konsentrasi senyawa-senyawa ester sinamat untuk mengetahui nilai SPF dilakukan pada  $\lambda_{maks}$ . Pelarut yang digunakan adalah etanol karena relatif tidak memberikan gangguan serapan terhadap senyawa yang dilarutkan.

#### 1. Senyawa 3,4-dimetoksi amil sinamat



**Gambar 2** Spektra senyawa 3,4-dimetoksi amil sinamat pada konsentrasi 1µg/mL

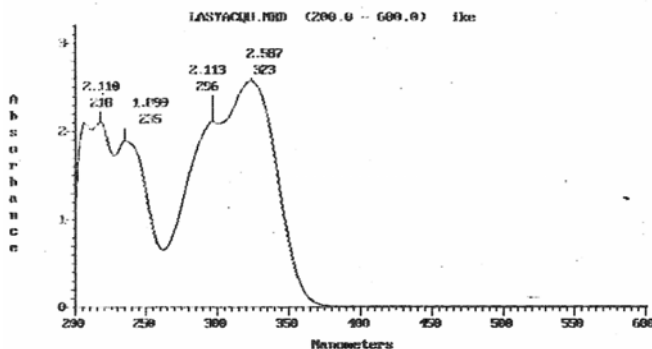


**Gambar 3** Grafik nilai SPF<sub>in vitro</sub> vs C senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat

Senyawa 3,4-dimetoksi amil sinamat memiliki serapan maksimal pada  $\lambda$  322 nm yang merupakan wilayah serapan UV-A. Pada wilayah UV-B tidak terdapat serapan dengan intensitas yang besar dan pada daerah tersebut kurva mengalami penurunan intensitas. Pada  $\lambda$  288 nm dengan intensitas 1,381 diketahui bahwa senyawa ini juga aktif di wilayah UV-C. Dengan demikian senyawa 3,4-dimetoksi amil sinamat memiliki aktivitas penyerapan sinar UV yang baik pada wilayah UV-A dan UV-C.

## 2. Senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat

Pengukuran  $\lambda_{maks}$  terhadap senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat hasil eksperimen pada konsentrasi 1µg/mL adalah 323 nm dengan intensitas 2,587. Selain harga tersebut juga terdapat puncak serapan di 296 nm dengan intensitas 2,113. Dengan demikian senyawa ini juga memiliki aktivitas serapan pada daerah UV-A dan UV-B seperti yang ditunjukkan oleh gambar 4.

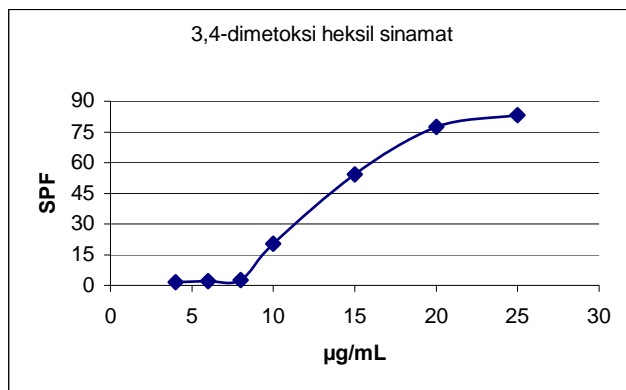


**Gambar 4** Spektra senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat pada konsentrasi 1µg/mL

Penentuan absorbansi terhadap deret konsentrasi senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat untuk mengetahui nilai SPF dilakukan pada  $\lambda$  323 nm sebagai puncak tertinggi..

$\lambda$  323 nm dapat dikatakan sebagai daerah transisi antara UV-B ( $\lambda$  290-320 nm) dan UV-A ( $\lambda$  320-400 nm). Akan tetapi dilihat dari luasan kurva, serapan 3,4-dimetoksi heksil sinamat cenderung ke arah UV-B. Hal ini diperkuat dengan adanya puncak pada 296 nm dan luas wilayah serapan UV-B lebih besar dibandingkan dengan luas wilayah serapan UV-A. Pada daerah 323-400 nm kurva mengalami penurunan bahkan tidak terdapat serapan pada daerah 400 nm. Jadi dapat disimpulkan bahwa senyawa dapat memberikan proteksi yang baik terhadap UV-B dibandingkan dengan UV-A. Sementara serapan pada daerah UV-C tidak memberikan intensitas yang berarti, berbeda dengan hasil prediksi. Nilai SPF senyawa disajikan dalam gambar 5.

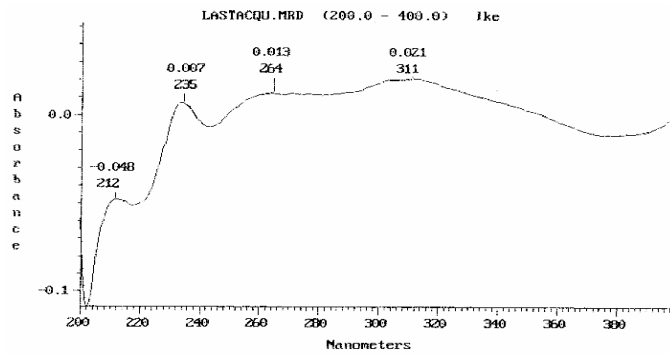
Proteksi maksimal diberikan pada kisaran konsentrasi 8-10  $\mu\text{g/mL}$ . Berarti senyawa ini cukup baik digunakan sebagai tabir surya karena mampu memberikan proteksi yang baik pada konsentrasi kecil. Untuk melihat hubungan konsentrasi dengan SPF dibuat grafik SPF versus konsentrasi (C). Dari analisis terhadap gambar 3 dapat diketahui konsentrasi senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat yang memberikan nilai SPF maksimal.  $C_{\text{opt}}$  adalah 9,555  $\mu\text{g/mL}$  dengan nilai SPF 15.



**Gambar 5** Grafik nilai  $\text{SPF}_{\text{in vitro}}$  vs C senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat

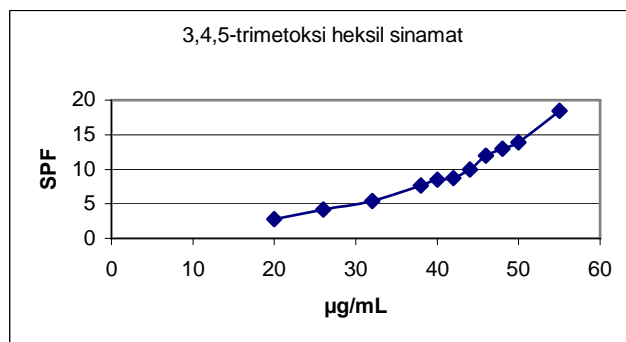
### 3. Senyawa 3,4,5-trimetoksi heksil sinamat

$\lambda_{\text{maks}}$  3,4,5-trimetoksi heksil sinamat adalah 311 nm yang merupakan  $\lambda$  daerah UV-A. Serapan senyawa pada wilayah UV-C (264 nm) melebar sampai wilayah UV-B. Dengan demikian dari hasil spektra alat spektrofotometer UV-Vis, senyawa dapat memberikan perlindungan dengan cara menyerap sinar UV pada wilayah UV-A, UV-B dan UV-C.



**Gambar 6** Spektra senyawa 3,4,5-trimetoksi heksil sinamat pada konsentrasi 1µg/mL

Nilai SPF maksimal dari deret konsentrasi senyawa 3,4,5-trimetoksi heksil sinamat adalah 13,876 dengan  $C_{opt}$  50 µg/mL.  $C_{opt}$  yang diperoleh masih terlalu besar bagi ukuran senyawa dengan aktivitas tabir surya. Besarnya nilai konsentrasi ini barangkali disebabkan rendahnya kemurnian senyawa.

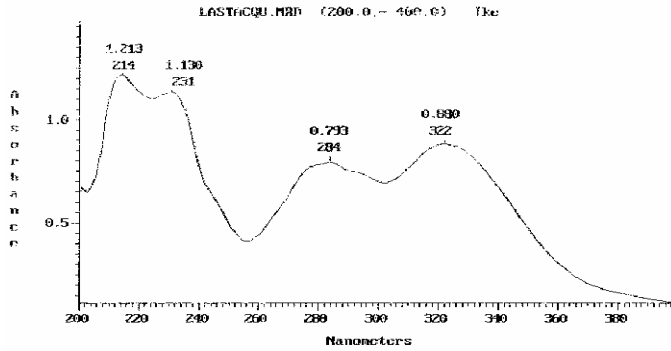


**Gambar 7** Grafik nilai  $SPF_{in vitro}$  vs C senyawa 3,4,5-trimetoksi heksil sinamat

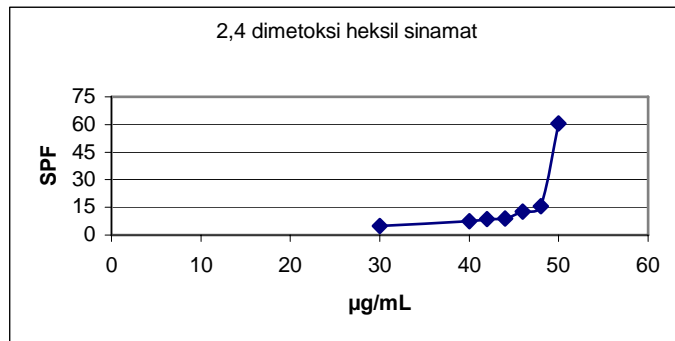
#### 4. Senyawa 2,4-dimetoksi heksil sinamat

Spektra senyawa menunjukkan bahwa senyawa aktif pada wilayah UV-A dan UV-C.  $C_{opt}$  adalah pada wilayah antara 46 dan 48 µg/mL dengan nilai SPF 12,7 dan 15,7.





**Gambar 8** Spektra senyawa 2,4-dimetoksi heksil sinamat pada konsentrasi 1µg/mL



**Gambar 9** Grafik nilai SPF vs C senyawa 2,4-dimetoksi heksil sinamat

### Analisis Senyawa Secara *in vivo*

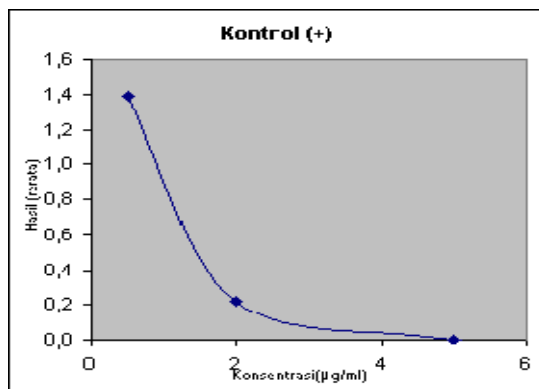
Pada penelitian ini, analisis secara *in vivo* tidak dapat memberikan data SPF karena hanya dilakukan secara kualitatif. Analisis dilakukan terhadap sifat anti inflamasi senyawa yang diukur dengan skor 0-4 untuk daerah kulit yang memberikan respon eritema. Untuk keperluan uji *in vivo* pelarut etanol berfungsi sebagai antiseptik dan mendinginkan (Djuanda, 1997). UV penyebab eritema adalah salah satu contoh percobaan untuk reaksi inflamasi yang digunakan untuk evaluasi senyawa baru yang memiliki aktivitas anti inflamasi baik secara topikal maupun sistemik pada hewan uji atau relawan (Thompson 1990). Metoda ini mendekati kenyataan karena inflamasi sering disertai dengan eritema (kemerahan), iritasi, *sunburn* (terbakar surya) dan efek toksik pada kulit. Pada penelitian ini lebih ditekankan pada efek terjadinya eritema. Pengukuran menggunakan cara topikal dengan hewan uji marmut.

Marmut dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kontrol positif, kontrol negatif dan senyawa uji. Sebelum di lakukan eksperimen, marmut diberi isoniazid supaya kulit lebih peka terhadap sinar. Isoniazid (INH) merupakan obat TBC yang jika dikonsumsi

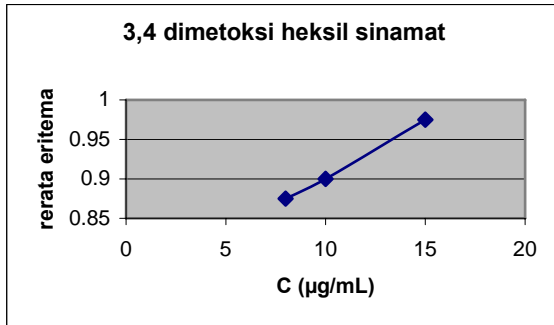
memiliki efek samping meningkatkan kulit terhadap berbagai respon lingkungan, salah satunya adalah sinar matahari (Medical Team of Mc. Kinley University, 2001). Kontrol positif yang digunakan adalah *lotion* yang mengandung oktil metoksi sinamat 7,5 %, benzofenon-3 3% dan titan dioksida 1,5% merk *Rossolare* dengan SPF 15. Dipilih *Rossolare* karena mengandung senyawa sinamat yang paling banyak beredar di pasaran sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai pembanding. Marmut kelompok kontrol negatif adalah kelompok marmut yang dipajan dengan sinar UV tanpa diberi TS.

**Tabel 1** Hasil uji *in vivo* terhadap senyawa-senyawa ester sinamat

No.	Senyawa	Konsentrasi	Rerata
1	Kontrol (+)	0,5	1,4
		2	0,2
		5	0,0
2	Kontrol (-)	-	1,9
3	3,4-dimetoksi amil sinamat	20	0,8
		25	1,2
		30	0,8
4	3,4-dimetoksi heksil sinamat	8	0,87
		10	0,9
		15	0,97
5	3,4,5-trimetoksi heksil sinamat	48	0,5
		50	0,1
		55	0,2
6	2,4-dimetoksi heksil sinamat	46	1,4
		48	0,9
		50	1,0



**Gambar 10** Grafik rerata penilaian eritema vs konsentrasi senyawa kontrol



**Gambar 11** Grafik rerata penilaian eritema vs konsentrasi senyawa 3,4- dimetoksi heksil sinamat

Banyaknya kontrol positif yang dipakai disesuaikan dengan standar uji yang ditetapkan oleh *Food and Drug Administration* (FDA) yaitu  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Levy, 2001). Pada penelitian ini dipilih variasi ketebalan  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  dan  $3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Proteksi maksimal berbanding lurus dengan ketebalan olesan *lotion* dan terjadi pada ketebalan  $3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Senyawa 3,4-dimetoksi amil sinamat, 3,4,5-trimetoksi heksil sinamat dan 2,4-dimetoksi heksil sinamat memiliki konsentrasi optimal yang besar. Hal ini disebabkan tingkat kemurnian senyawa yang rendah. Pada penelitian ini yang memberikan data relatif baik adalah senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat.

Pada senyawa 3,4-dimetoksi heksil sinamat nilai rerata eritema naik seiring naiknya konsentrasi senyawa. Pada analisis *in vitro* proteksi maksimal diberikan oleh konsentrasi  $9,555 \mu\text{g}/\text{mL}$  dengan nilai SPF 15 dan konsentrasi di atas  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  memberikan proteksi ultra. Senyawa dengan nilai SPF maksimal relatif aman bagi kulit karena konsentrasi senyawa tidak terlalu besar sehingga mampu memberikan proteksi yang baik terhadap sinar UV. Data *in vivo* pada grafik 11 memperkuat pernyataan tersebut. Menurut Levy (2001), TS dengan nilai SPF 15 mampu melindungi kulit dari radiasi sinar UV-B dengan efektivitas sebesar 93%. Nilai SPF senyawa yang besar barangkali efektif menghalangi sinar UV akan tetapi besarnya konsentrasi senyawa dikhawatirkan menimbulkan efek iritasi pada kulit yang justru akan membahayakan.

## KESIMPULAN

Dari hasil-hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa senyawa-senyawa ester sinamat hasil sintesis bekerja pada wilayah panjang gelombang UV-A, UV-B, UV-C dan

memiliki nilai SPF maksimal pada konsentrasi antara 9-50  $\mu\text{g/mL}$  menurut analisis *in vitro* dan pada analisis *in vivo* dengan hewan uji marmut mampu melindungi kulit dari eritema dibuktikan dengan skor rerata eritema di bawah kontrol negatif (di bawah 1,9).

### UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada proyek *QUE* jurusan kimia yang telah memberikan pendanaan melalui *Project Grant* tahun anggaran 2001/2002.

### DAFTAR PUSTAKA

- American Cancer Society, 2001, *Skin Cancer Fact Sheet*, <http://www.aad.org/skincancernews/Whatisskincancer/scancerfacts.html>, diakses tanggal 31 Juli 2001
- Djuanda, A., 1997, *Pengobatan Topikal dalam Bidang Dermatologi*, Cetakan Pertama, Yayasan Penerbitan Ikatan Dokter Indonesia, Jakarta
- Levy, S.B., 2001, *Sunscreens and Photoprotection*, <http://www.eMedicine.com>, diakses tanggal 31 Juli 2001
- Medical Team of Mc. Kinley University, 2001, *INH*, <http://www.mckinley.uiuc.edu>, diakses Agustus 2002
- Perwitasari, I, Chandra, D.K., Etnawati dan Suyoto, 1999, *Peran Tabir Surya Kombinasi Sinamat dan Benzophenon pada Perubahan Warna Kulit Konstitutif Akibat Paparan UV-B*, Kupulan Jurnal Kosmetik Medik, FKU-UGM
- Satiadarma, H. dan Suyoto, 1986, *Kesehatan Kulit dan Kosmetika*, Andy Offset, Yogyakarta
- Tahir, I., Raharjo, T.J. Noegrohati, S., dan Wahyuningsih, T.D. 2000, *Sintesis Senyawa Penerap sinar UV : Sintesis Senyawa Alkil Sinamat Tersubstitusi dari Komponen Minyak Fusel dan Minyak Adas*, Laporan Penelitian Hibah Bersaing VIII/2, Dikti, Yogyakarta
- Walters, C., Keeney, A., Wigal, C.T., Johnston dan Cornelius, R., 1997, The Spectrophotometric Analysis and Modelling of Sunscreens, *J. Chem. Educ*, 74, 1, 99-101
- Thompson, E.B., 1990, *Drug Evaluation Techniques in Pharmacology*, The University of Illinois, Chicago