

Penentuan Kadar Flavonoid pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode NIR dan Kemometrik (*Determination of Flavonoid in Leave Extracts Using NIR and Chemometric*)

Hilmia Lukman, Lesty Wulandari, Yuni Retnaningtyas
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: hilmialukman@gmail.com

Abstract

Flavonoids are a group of natural compounds with variety phenolic structures and are found in plants. The aim of this research was to study whether NIR and chemometric methods could be used to determine the flavonoid content. These methods were compared to UV-Vis spectrofotometry. Flavonoid was extracted from plant leaves by ultrasonic and maceration. NIR spectral data of selected leave extracts were correlated with flavonoid content using chemometric. In this study, the chemometric method that used for quantitative and qualitative analysis were Partial Least Square (PLS) and Linear Discriminant Analysis (LDA), respectively. The PLS R^2 calibration was 0.9916499 and RMSEC was 2.1521897. In addition, the R^2 of LOOCV and 2-Fold-Cross-Validation were 0.9986664 and 0.9823225, respectively. Furthermore, LDA gave accuracy of 100%. The significance of flavonoid content that have been measured by NIR and UV-Vis spectrofotometry was evaluated with paired samples t-test. In conclusion, flavonoid content that have been measured with both methods gave no significant difference.

Keywords: *flavonoid, chemometric, LDA, NIR, PLS*

Abstrak

Flavonoid adalah senyawa dengan berbagai struktur fenolik dan banyak ditemukan pada tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah metode NIR dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid. Metode spektrofotometri UV-Vis digunakan sebagai pembanding. Flavonoid diekstraksi dari daun tanaman menggunakan metode ultrasonik dan maserasi. Data spektra NIR dari ekstrak daun terpilih dihubungkan dengan kadar flavonoid menggunakan metode kemometrik. Metode kemometrik yang digunakan untuk analisis kuantitatif dan analisis kualitatif dalam penelitian ini masing-masing adalah *Partial Least Square* (PLS) dan *Linear Discriminant Analysis* (LDA). Model PLS memberikan hasil yang baik dengan nilai R^2 kalibrasi sebesar 0,9916499 dan RMSEC sebesar 2,1521897. Selain itu, nilai R^2 LOOCV dan R^2 2-Fold-Cross-Validation masing-masing sebesar 0,9986664 dan 0,9823225, sedangkan model klasifikasi LDA memberikan akurasi sebesar 100%. Hasil penetapan kadar sampel yang diperoleh dari metode NIR dan spektrofotometri UV-Vis kemudian diuji dengan uji t dua sampel berpasangan dan dapat disimpulkan bahwa kadar yang diperoleh tidak memiliki perbedaan yang bermakna.

Kata kunci: flavonoid, kemometrik, LDA, NIR, PLS

Pendahuluan

Daun merupakan suatu bagian tumbuhan yang penting. Daun umumnya tipis melebar dan kaya akan suatu zat warna hijau yang dinamakan klorofil [1]. Fungsi utama daun adalah membuat makanan melalui fotosintesis [2]. Pada beberapa bagian tanaman, terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis, banyak ditemukan senyawa fenolik terutama flavonoid [3].

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan dalam tumbuhan [3]. Flavonoid diketahui memiliki sifat antioksidan, antimikroba, antialergi, anti-virus, antiinflamasi, dan vasodilator [4].

Metode analisis yang umum di-gunakan

untuk menentukan kadar flavonoid antara lain kromatografi gas [5], spektrometri massa [6], kromatografi lapis tipis [7], metode kolorimetrik [8], spektrofotometri ultraviolet [9], kromatografi cair kinerja tinggi [10], dan elektroforesis kapiler [11]. Namun, metode-metode tersebut membutuhkan tahapan analisis yang panjang dan waktu analisis yang cukup lama [12].

Spektrofotometri inframerah merupakan teknik analisis yang berdasarkan pada vibrasi atom pada molekul. Salah satu keuntungan dari spektroskopi inframerah adalah non-destruktif, jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit, dan hampir semua bentuk sampel dapat diteliti [13]. Selain itu, teknik spektroskopi inframerah hampir tidak

memerlukan pelarut kimia sehingga lebih ramah lingkungan [14].

Teknik kemometrik seperti analisis multivariat dapat digunakan untuk memudahkan analisa data yang dihasilkan oleh spektrum inframerah [15]. Keuntungan dari penggunaan teknik kemometrik untuk interpretasi spektrum inframerah adalah kemampuannya dalam menghubungkan profil spektrum dengan informasi yang terdapat pada sampel [16].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah metode NIR dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid, mengetahui kadar flavonoid pada sampel nyata dan mengidentifikasi signifikansi kadar flavonoid dengan spektrum inframerah dibandingkan dengan metode perbandingan.

Metode Penelitian

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (UV-Vis Hitachi U 1800), spektroskopi NIR (Brimrose Luminar 3070), perangkat lunak Brimrose, perangkat lunak Prospect, perangkat lunak *The Unscrambler X 10.2* (Camo), *ultrasonicator* (Elmasonic), *rotavapour*, oven (Mettler), dan timbangan analitik digital (Sartorius).

Bahan yang digunakan adalah simplisia daun (Tabel 1) yang berasal dari UPT Materia Medica Kecamatan Batu Kabupaten Malang, ekstrak daun yang telah tersedia (Tabel 2), kapsul stimulo (Dexa medica), kapsul daun salam (Herbal indo utama), metanol 98% teknis, etanol 96% teknis, kuersetin (Sigma-Aldrich), aluminium klorida (Merck), kalium asetat (UPT BPPTK LIPI), akuades, dan aerosil (*pharmaceutical grade*).

Tabel 1. Simplisia yang digunakan

No	Kode	Simplisia tanaman
1	C	<i>Psidium guajava</i>
2	D	<i>Sauropus androgynus</i>
3	E	<i>Tithonia diversifolia</i>
4	F	<i>Mangifera indica</i>
5	G	<i>Pandanus amaryllifolius</i>
6	I	<i>Euphorbiae hirtae</i>
7	J	<i>Carica papaya</i>
8	N	<i>Piper betle</i>
9	O	<i>Annona muricata</i>
10	P	<i>Anredera cordifolia</i>
11	Q	<i>Kaempferia rotunda</i>
12	R	<i>Leucaena glauca</i>
13	S	<i>Morinda citrifolia</i>

Tabel 2. Ekstrak daun yang sudah jadi

No	Kode	Simplisia tanaman
1	A	<i>Coffea arabica</i> (muda)
2	B	<i>Coffea arabica</i> (tua)
3	H	<i>Momordica charantia</i>
4	K	<i>Mimosa pudica</i>
5	L	<i>Andrographis paniculata</i>
6	M	<i>Piper ornatum</i>
7	T	<i>Coffea canephora</i> (muda)

Prosedur penelitian

Pengumpulan sampel untuk *training set* dan *test set*

Sampel diperoleh dari ekstrak daun yang sudah tersedia di laboratorium-laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember dan dari pembuatan ekstrak daun yang dilakukan oleh peneliti. Sampel dipilih berdasarkan jumlah masing-masing ekstrak yang tersedia di laboratorium-laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember berdasarkan teknik pengambilan sampel *purposive sampling*. Teknik ini juga berlaku dalam pengambilan sampel yang tidak mengandung flavonoid (matriks), dimana matriks yang dipilih adalah zat yang umum terdapat dalam ekstrak dan pengering yang umum digunakan serta tersedia di laboratorium, yaitu akuades dan aerosil.

Pembuatan ekstrak

Sebanyak 80 g serbuk daun kering diultrasonikasi dalam 800 ml metanol 98% selama 1 jam. Hasil ekstraksi dengan ultrasonikasi kemudian didiamkan selama 24 jam. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol. Ekstrak kental kemudian dikeringkan dengan aerosil. Selanjutnya ekstrak kering digerus sampai halus dan diayak dengan ayakan B-60.

Pengukuran Pantulan Spektrum NIR

Instrumen NIR dihidupkan dan ditunggu selama 30 menit. Selanjutnya dibuka perangkat lunak Brimrose. Sampel diletakkan di atas plat tempat sampel secara merata. Satu sampel dipindai 4 kali dan dilakukan 3 kali penembakan pada masing-masing *scanning*. Langkah-langkah tersebut diulangi untuk masing-masing sampel. Selanjutnya data yang telah diperoleh diolah dengan perangkat lunak *The Unscrambler X 10.2* (Camo *software*).

Penentuan Kadar Flavonoid Total dengan Spektrofotometer UV-Vis

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan reagen aluminium klorida [12]. Sebanyak 0,5 ml larutan ekstrak dengan konsentrasi 200 µg/ml dilarutkan

1,5 mL etanol, ditambahkan 0,1 ml AlCl₃ 10%, ditambahkan 0,1 mL potasium asetat 1M, ditambahkan akuades sampai tanda, didiamkan 30 menit, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 432 nm. Blangko yaitu semua reagen tanpa larutan ekstrak. Dibuat perhitungan rata-rata dua kali pengukuran dan kandungan flavonoid dinyatakan dengan kesetaraan pembandingan baku kuersetin [12].

Pembentukan model klasifikasi dan kalibrasi

Model kalibrasi (*training set*) untuk analisis kuantitatif dalam penelitian ini dibentuk dengan teknik analisis multivariat PLS, sedangkan model klasifikasi yang digunakan dibentuk dengan teknik analisis multivariat LDA. Masing-masing model yang telah terbentuk kemudian divalidasi menggunakan dua teknik validasi silang, tehnik yang pertama adalah *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV) dengan mengolah data *training set* pada perangkat lunak *The Unscrambler X 10.2* dan teknik kedua adalah validasi silang *2-Fold-Cross-Validation* (*test set*) menggunakan sampel ekstrak yang berbeda dari sampel-sampel yang digunakan dalam *training set*. Identitas sample *training set* dan *test set* dapat dilihat pada Tabel 3.

Aplikasi pada sampel ekstrak nyata

Model kalibrasi yang telah dinyatakan valid kemudian diterapkan pada penetapan kadar sampel nyata (kapsul stimuno dan kapsul daun salam) dengan instrumen NIR. Kadar yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan kadar yang diperoleh dari metode pembandingan. Kadar yang diperoleh dari kedua metode tersebut kemudian diuji dengan uji t dua sampel berpasangan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kadar yang diberikan keduanya.

Tabel 3. Identitas sample *training set* dan *test set*

No	Kode	Identitas sample
1	A	<i>Training set</i>
2	B	<i>Training set</i>
3	C	<i>Training set</i>
4	D	<i>Training set</i>
5	E	<i>Training set</i>
6	F	<i>Training set</i>
7	G	<i>Training set</i>
8	H	<i>Training set</i>
9	I	<i>Training set</i>
10	J	<i>Training set</i>
11	K	<i>Training set</i>
12	L	<i>Training set</i>
13	M	<i>Training set</i>

14	N	<i>Training set</i>
15	O	<i>Training set</i>
16	P	<i>Test set</i>
17	Q	<i>Test set</i>
18	R	<i>Test set</i>
19	S	<i>Test set</i>
20	T	<i>Test set</i>

Hasil Penelitian

Penetapan kadar sampel *training set* dan *test set* dengan metode spektrofotometri UV-Vis

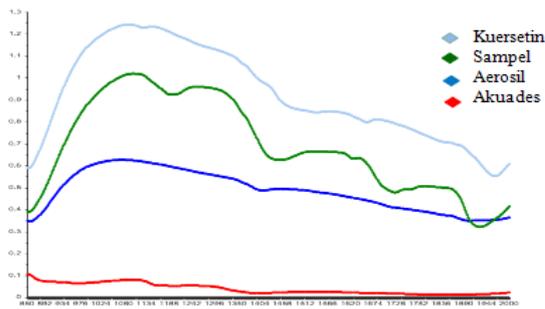
Kadar flavonoid total dinyatakan dengan gram kuersetin ekuivalen tiap gram ekstrak menggunakan persamaan kurva baku $y = 0,094x + 0,068$ ($R^2=0,993$). Hasil penetapan flavonoid total ekstrak daun tanaman dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar flavonoid sampel *training set* dan *test set*

No	Kode	Rata-rata mg QE/g ekstrak
1	A	9,8728
2	B	11,2329
3	C	51,4856
4	D	31,5279
5	E	24,1696
6	F	35,6115
7	G	9,7357
8	H	32,7400
9	I	27,8700
10	J	32,5536
11	K	15,0597
12	L	39,2250
13	M	26,4079
14	N	36,4585
15	O	40,2475
16	P	14,3892
17	Q	20,2946
18	R	46,0695
19	S	26,2316
20	T	4,0275

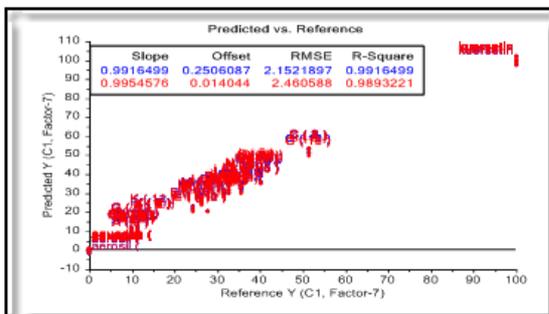
Pembentukan model klasifikasi dan kalibrasi

Data spektrum yang dihasilkan dari penentuan data NIR baik untuk standart kuersetin, sampel ekstrak, maupun matriks yang digunakan untuk membentuk model klasifikasi dan kalibrasi kemometrik ditunjuk-kan pada Gambar 1. Dapat dilihat bahwa spektrum antara kuersetin dan sampel memiliki karakteristik spektrum yang mirip. Perbedaannya hanya pada nilai transmittan pada tiap spektrum. Pada gambar tersebut yang memiliki nilai transmittan tertinggi adalah spektrum dari kuersetin kemudian di bawahnya diikuti spektrum dari sampel. Sedangkan matriks memiliki karakteristik spektrum yang berbeda dengan kuersetin.



Gambar 1. Spektrum gabungan (standart, ekstrak, dan matriks)

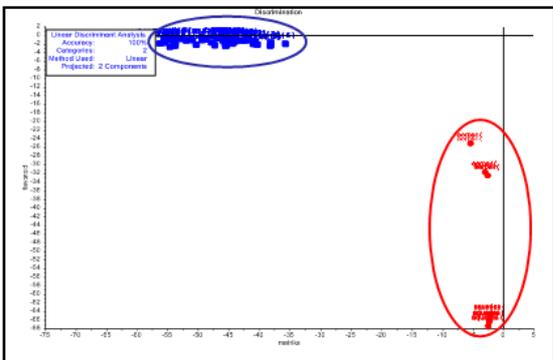
Data korelasi hasil pembentukan model kalibrasi dengan analisis multivariat PLS ditunjukkan pada Gambar 2. Pada gambar tersebut terdapat nilai R^2 dan RMSEC. Dapat dilihat bahwa model tersebut memiliki nilai R^2 kalibrasi sebesar 0,9916499 dan RMSEC sebesar 2,1521897.



Gambar 2. Data korelasi model kalibrasi

Hasil pembentukan model klasifikasi dengan analisis multivariat LDA ditunjukkan pada Gambar 3. Gambar tersebut terdiri dari kategori flavonoid dan matriks. Dapat dilihat bahwa nilai akurasi adalah 100%.

Hasil validasi silang model kalibrasi dan model klasifikasi dengan metode *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV) dan *2-Fold-Cross-Validation* (*test set*) dapat dilihat pada Tabel 5.



Gambar 3. Pemetaan model klasifikasi

Tabel 5. Hasil validasi silang model yang terbentuk

Model	Validasi silang
-------	-----------------

	LOOCV	2-Fold-Cross-Validation
Kalibrasi R^2	= 0,9986664	$R^2 = 0,9823225$
Klasifikas Akurasi	= 100%	Akurasi = 100%

Penerapan model PLS dan LDA terhadap sampel Model PLS yang telah terbentuk dalam perangkat lunak *The Unscramble X 10.2* diterapkan dalam analisis kuantitatif sampel, yaitu untuk menentukan kadar sampel flavonoid dengan metode spektroskopi NIR. Nilai rata-rata kadar flavonoid total dalam sampel yang ditunjukkan dengan mg QE/g ekstrak dimasukkan dalam set data pada perangkat lunak *The Unscramble X 10.2* sebagai data pembanding (kadar teoritis) ketika menentukan kadar dengan spektroskopi NIR. Data kadar hasil percobaan dengan NIR tercantum pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil percobaan dengan NIR dan dengan metode pembanding (spektrofotometri UV-Vis)

Sampel nyata	Kadar flavonoid (mg QE/g ekstrak) dengan NIR	Kadar flavonoid (mg QE/g ekstrak) dengan spektrofotometri UV-Vis
Stimuno	$36,3053 \pm 2,78^a$	$35,9433 \pm 0,14^a$
Daun salam	$17,1862 \pm 0,06^a$	$15,1241 \pm 0,02^a$

Keterangan: Data disajikan sebagai rata-rata \pm SD (n=3), notasi huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar sampel (uji t berpasangan, $p < 0,05$).

Pembahasan

Berdasarkan hasil penetapan kadar flavonoid total sampel *training set* dan *test set* dengan metode spektrofotometri UV-Vis, diketahui ekstrak C mempunyai kadar flavonoid total tertinggi yaitu sebesar 51.4856 mg QE/g ekstrak. Sedangkan kadar flavonoid total terendah yaitu ekstrak T sebesar 4.0275 mg QE/g ekstrak.

Pembentukan model kalibrasi dengan PLS dalam penelitian ini dibentuk dari 15 set kalibrasi (*training set*). Seluruh set kalibrasi telah diperoleh data absorbansi-nya pada panjang gelombang 850 - 2000 nm. Pemilihan set data yang digunakan harus memenuhi spesifikasi berdasarkan nilai R^2 dan RMSEC. Nilai R^2 menunjukkan seberapa dekat hubungan antara nilai kenyataan dengan nilai prediksi dari instrumen NIR. Nilai R^2 merupakan nilai korelasi dimana pemilihan model terbaik apabila nilai korelasi yang diperoleh lebih dari 0,99, dan nilai galat yaitu nilai RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*) dengan nilai

semakin kecil [17]. Nilai R^2 yang ditunjukkan pada Gambar 1 membuktikan bahwa model tersebut mempunyai tingkat linieritas yang baik. Nilai galat yang ditampilkan dari model tersebut juga baik yang artinya model yang terbentuk tidak memiliki penyimpangan dalam memprediksi konsentrasi hasil prediksi dengan konsentrasi sebenarnya.

Model klasifikasi dalam penelitian ini dibuat dengan LDA. Kemampuan model dalam membedakan sampel yang mengandung flavonoid dengan sampel yang tidak mengandung flavonoid (matriks) dapat dilihat berdasarkan nilai akurasi terhadap sampel dalam *training set*. Pemetaan model LDA yang telah terbentuk sesuai Gambar 2 menunjukkan bahwa nilai akurasi adalah 100% yang menunjukkan bahwa model tersebut dapat mengklasifikasikan ke-15 sampel *training set* dengan benar.

Kebenaran model kalibrasi dan klasifikasi yang terbentuk kemudian diuji dengan validasi silang. Teknik validasi silang bermanfaat untuk melakukan tes secara independen [18]. Untuk memvalidasi model kalibrasi yang telah terbentuk, dilakukan validasi yaitu *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV) dan *2-Fold Cross Validation* dengan sampel independen (menggunakan sampel baru diluar sampel *training set*). Data pada Tabel 5 menunjukkan bahwa dapat diketahui bahwa validasi LOOCV untuk model yang terpilih menunjukkan nilai R^2 validasi yang baik. Nilai tersebut menunjukkan hubungan antara kadar flavonoid dalam sampel *training set* yang sebenarnya dibandingkan dengan kadar yang diprediksi oleh model berdasarkan variabel respon dari metode perbandingan. Nilai R^2 dalam penelitian ini tergolong mempunyai korelasi yang baik karena lebih dari 0,9 sehingga model dapat disimpulkan mempunyai kemampuan yang baik dalam memprediksi konsentrasi dari sampel. Sedangkan, pada validasi silang model klasifikasi LDA dari data set validasi LOOCV diketahui bahwa tidak ada satupun kelompok sampel yang masuk dalam kelas yang salah.

Metode validasi lain yang digunakan adalah *2-fold cross validation*. Pada penelitian ini, validasi ini menggunakan 5 sampel independen (*test set*) dengan konsentrasi yang telah diketahui. Sampel tersebut kemudian diprediksi menggunakan model kalibrasi terpilih. Korelasi antara konsentrasi hasil prediksi model dengan konsentrasi teoritis diketahui dengan melihat nilai R^2 prediksi. Nilai R^2 seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5 menunjukkan bahwa model kalibrasi dari sampel *training set* yang telah dibentuk memiliki reliabilitas yang baik untuk diimplementasikan. Model klasifikasi LDA yang divalidasi dengan menggunakan 5 data sampel *test set* yang dikelompokkan sesuai dengan kategori yang telah ditentukan. Hasil validasi menunjukkan bahwa nilai akurasi adalah 100% artinya yang

menunjukkan bahwa model tersebut dapat mengklasifikasi-kan ke-5 sampel *training set* dengan benar.

Model PLS yang telah terbentuk dalam perangkat lunak *The Unscramble X 10.2* diterapkan dalam analisis kuantitatif sampel, yaitu untuk menentukan kadar sampel flavonoid dengan metode spektroskopi NIR. Hasil penetapan kadar dengan menggunakan dua metode (Tabel 6) kemudian dihitung nilai signifikansinya dengan analisis statistik uji t dua sampel berpasangan. Analisis statistik dengan uji t dua sampel berpasangan terhadap data tersebut dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna pada kadar sampel nyata yang ditetapkan dengan kedua metode, dimana nilai signifikansi yang diperoleh adalah 0,202 dengan tingkat kepercayaan 95%.

Analisis sampel secara kualitatif dilakukan dengan metode LDA. Model yang telah terpilih digunakan untuk memprediksi sampel yang belum diketahui klasifikasinya. Berdasarkan hasil prediksi menggunakan LDA, dapat diketahui bahwa seluruh sampel diklasifikasikan dalam kategori yang benar dengan perhitungan kemampuan prediksi sebesar 100% [19].

Simpulan dan Saran

Metode spektroskopi inframerah dekat (NIR) dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dibentuk model kalibrasi sampel tanaman untuk penentuan beberapa kandungan fitokimia.

Daftar Pustaka

- [1] Tjitrosoepomo G. Morfologi Tumbuhan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2005.
- [2] Cutter E. Plant Anatomy: Experiment and Interpretation Part 2 Organs.
- [3] Kumar S, Pandey A. Chemistry and biological activities of flavonoids: An Overview. Sci J. 2013;2013.
- [4] Pietta P. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. 2000;63:1035–42.
- [5] Bankova V, Christov R, Stoev G, Popov S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. J Chromatogr. 1992;607:150–3.
- [6] Markham KR. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Bandung: ITB Press; 1988.
- [7] Park Y, Koo M, Ikegaki M, Contado J. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. Arq Biol Tecnol. 1997;40:97–106.

- [8] Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res.* 1998;37:99–105.
- [9] Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000.
- [10] Merken H, Beecher G. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatogr A.* 2000;897:177–84.
- [11] Marchart E, Krenn L, Kopp B. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. *Planta Med.* 2003;69:452–6.
- [12] Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 2002;10(3):178–82.
- [13] Stuart B. *Infrared Spectroscopy: Fundamental and Applications.* Philadelphia: Saunders College Publishing; 2004.
- [14] Rohman A, Che Man Y. FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard in the mixtures with body fat of lamb, cow, and chicken. *Intl Food ResJ.* 2010;17:519–26.
- [15] Gad H, El-Ahmady S, Abou-Shoer M, Al-Azizi M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. *Phytochem Anal.* 2012;24:1–24.
- [16] Zou H, Yang G, Qin Z, Jiang W, Du A, Aboul-Enein H. Progress in quality control of herbal medicine with IR fingerprint spectra. *Anal Lett.* 2005;38:1457–75.
- [17] Rohman A, Che Man YB. Analysis of cod-liver oil adulteration using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc.* 2009;86:1149–53.
- [18] Stchur P, Cleveland D, Zhou J, Michel R. A review of recent applications of near infrared spectroscopy, and the characteristics of a novel PbS CCD array - based near infrared spectrometer. *Appl Spect Rev.* 2002;37:383–428.
- [19] Stanimirova I, Ustun B, Cajka T, Riddlelova K, Hajslova J, Buydens LM, et al. Tracing the geographical origin of honeys using the GCxGC-MS and pattern recognition techniques. *Food Chem.* 2010;118:171–6.