

Penentuan Kadar Fenol Total pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi NIR dan Kemometrik (*Determination of Total Phenolic in Leave Extracts Using Spectroscopy NIR and Chemometric*)

Fracilia Arinda Ratnasari, Lesty Wulandari, Nia Kristiningrum
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: fraciliarinda@gmail.com

Abstract

Phenols are group which having one or more hydroxyl groups which attached in aromatic ring and are found in plants. The aim of this research was to study whether NIR and chemometric methods could be used to determine the total phenol content of leave extracts. These methods were compared to UV-Vis spectrophotometry. Phenol was extracted from plant leaves by ultrasonic and maceration. NIR spectral data of selected leave extracts were correlated with total phenol 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 0.9920369 and RMSEC was 2.0049472. In addition, the R^2 of LOOCV and 2-Fold-Cross-Validation were 0.9939401 and 0.9834646, respectively. Furthermore, LDA gave accuracy of 100%. The significance of phenol total that have been measured by NIR and UV-Vis spectrophotometry was evaluated with paired samples T-test and gave no significant difference. In conclusion, total phenol content can be measured using NIR and chemometric methods.

Keywords: phenol, chemometric, LDA, NIR, PLS

Abstrak

Fenol adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik dan banyak ditemukan pada tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah metode NIR dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar fenol total pada ekstrak daun tanaman. Metode spektrofotometri UV-Vis digunakan sebagai pembandingan. Fenol diekstraksi dari daun tanaman menggunakan metode ultrasonik dan maserasi. Data spektra NIR dari ekstrak daun terpilih dihubungkan dengan kadar fenol 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 0.9920369 dan RMSEC sebesar 2,0049472. Selain itu, nilai R^2 LOOCV dan R^2 2-Fold-Cross-Validation masing-masing sebesar 0,9939401 dan 0,9834646, 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 memberikan hasil tidak memiliki perbedaan yang bermakna. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa kadar fenol total pada daun tanaman dapat ditentukan dengan menggunakan metode NIR dan kemometrik.

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

Pendahuluan

Daun merupakan satu dari struktur utama pada tanaman [1]. Fungsi utama daun adalah melakukan proses fotosintesis [2]. Bagian tanaman terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis banyak

ditemukan senyawa fenol [3]. Fenol merupakan senyawa yang memiliki satu atau lebih cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil [4]. Fenol memiliki aktivitas sebagai antioksidan, sehingga dapat mencegah adanya morbiditas dan mortalitas dari penyakit degeneratif [5].

Metode analisis yang umum digunakan untuk menentukan kadar fenol total antara lain kromatografi lapis tipis [6,7], kromatografi kertas [7], kromatografi gas [7], kromatografi cair kinerja tinggi [7], dan elektroforesis kapiler [7]. Namun, metode-metode tersebut membutuhkan banyak tenaga dan waktu sehingga diperlukan pengembangan teknik analisis yang cepat dan dapat dipercaya [8].

Spektroskopi NIR merupakan suatu pilihan yang efektif karena merupakan teknik analisis non destruktif, dapat menganalisis dengan kecepatan tinggi, tidak menimbulkan polusi dan tidak memerlukan bahan kimia [9]. Namun pita spektrum dari NIR sangat rumit dan tumpang tindih sehingga sulit diinterpretasikan. Oleh karena itu dibutuhkan teknik kemometrik seperti analisis multivariat [10].

Manfaat dari metode statistik multivariat tersebut adalah kemampuannya dalam mengetahui informasi spektrum yang diperlukan dari spektrum inframerah dan menggunakan informasi spektrum tersebut untuk aplikasi kualitatif dan kuantitatif [11].

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

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer 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), evaporator, oven (Mettler), dan timbangan analitik digital (Sartorius).

Bahan yang digunakan adalah simplisia daun (Tabel 1) yang berasal dari UPT Materia Medika Kota Batu-Malang, ekstrak daun yang sudah jadi (Tabel 2), kapsul stimuno (Dexa Medica), kapsul daun salam (Herbal Indo Utama), metanol 98% teknis, asam galat (Sigma-Aldrich), Folin Ciocalteu (Merck), Na₂CO₃ teknis (Brataco), akuades, dan aerosil (*pharmaceutical grade*).

Tabel 1. Simplisia yang digunakan

No	Kode	Simplisia tanaman
1	S	<i>Mangifera indica</i>
2	C	<i>Phaseolus vulgaris</i>
3	T	<i>Carica papaya</i>
4	M	<i>Piper betle</i>
5	G	<i>Morinda citrifolia</i>
6	P	<i>Anredera cordifolia</i>
7	D	<i>Psidium guajava</i>
8	R	<i>Leucaena glauca</i>
9	O	<i>Annona muricata</i>
10	Q	<i>Averrhoa bilimbi</i>
11	H	<i>Pandanus amaryllifolius</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	I	<i>Momordica charantia</i>
4	J	<i>Ruellia tuberosa</i>
5	E	<i>Ocimum basilicum</i>
6	N	<i>Piper crocatum</i>
7	F	<i>Artocarpus altilis</i>
8	K	<i>Coffea canephora</i> (muda)
9	L	<i>Coffea canephora</i> (tua)

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 fenol (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 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 tiap-tiap pemindaian. Langkah-langkah tersebut diulangi untuk masing-masing sampel. Selanjutnya data yang telah diperoleh diolah dengan perangkat lunak The Unscrambler X 10.2.

Penentuan Kadar Fenol Total dengan Spektrofotometri UV-Vis

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis menggunakan reagen Folin Ciocalteu [12]. Sebanyak 400 µl larutan sampel dari masing-masing larutan uji ekstrak dan larutan standar ditambahkan dengan 400 µl Folin-Ciocalteu (1:10 v/v air). Setelah itu didiamkan selama 6 menit. Setelah 6 menit, ditambahkan 3200 µl Na₂CO₃ (75 g/L air). Campuran ini didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit dan selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 628 nm. Dibuat perhitungan rata-rata dua kali pengukuran dan kandungan fenol total dinyatakan dengan kesetaraan pembanding baku asam galat [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 pembanding. 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 fenol total dinyatakan dengan gram asam galat ekuivalen tiap gram ekstrak menggunakan persamaan kurva baku $y = 0,0448x - 0,3602$ dengan nilai $R = 0,9943$. Hasil penetapan fenol total ekstrak daun tanaman dapat dilihat pada Tabel 4.

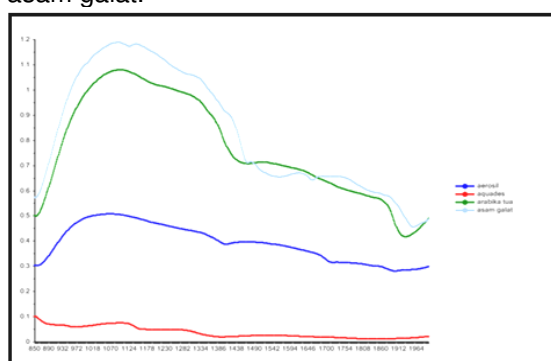
Tabel 4. Hasil penetapan kadar fenol total sampel *training set* dan *test set*

No	Kode	Kadar fenol total (mg GAE/g ekstrak)
1	A	61,515 ± 0,40
2	B	94,805 ± 0,69
3	C	52,212 ± 1,76
4	D	233,616 ± 0,40
5	E	34,134 ± 0,92
6	F	64,524 ± 0,36
7	G	18,420 ± 1,71
8	H	19,595 ± 1,72
9	I	33,643 ± 1,49
10	J	79,259 ± 0,36
11	K	163,296 ± 0,39
12	L	108,884 ± 0,96
13	M	28,911 ± 1,31
14	N	30,189 ± 0,55
15	O	46,071 ± 0,65
16	P	26,010 ± 0,72
17	Q	84,326 ± 0,74
18	R	51,321 ± 1,25
19	S	241,633 ± 0,19
20	T	26,589 ± 0,49

Keterangan: Data disajikan sebagai rata-rata ± RSD (n=3)

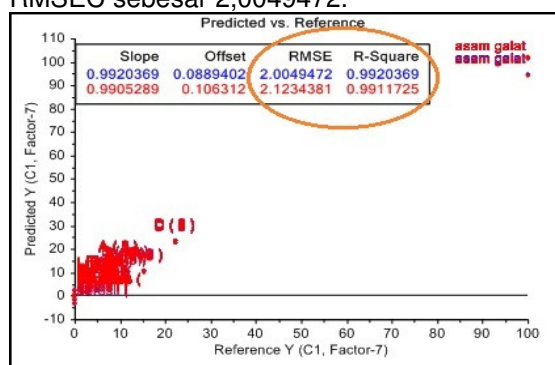
Pembentukan Model Klasifikasi dan Kalibrasi

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



Gambar 1. Spektrum gabungan (standar, 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 0,9920369 dan RMSEC sebesar 2,0049472.

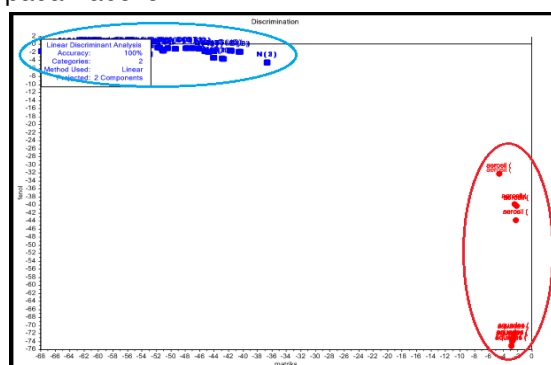


Gambar 2. Data korelasi model kalibrasi

Hasil pembentukan model klasifikasi dengan analisis multivariat LDA ditunjukkan pada Gambar 3. Gambar tersebut terdiri dari kategori fenol dan matriks. Dapat diketahui 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	= 0.9939401	R^2 = 0.9834646
Klasifikasi Akurasi	= 100%	Akurasi = 100%

Penerapan model PLS dan LDA terhadap sampel

Model PLS yang telah terbentuk dalam perangkat lunak The Unscrambler X 10.2 diterapkan dalam analisis kuantitatif sampel, yaitu untuk menentukan kadar sampel fenol total dengan metode spektroskopi NIR. Nilai rata-rata kadar fenol total dalam sampel yang ditunjukkan dengan mg GAE/g ekstrak dimasukkan dalam set data pada perangkat lunak The Unscrambler 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 fenol total (mg GAE/g ekstrak)	
	NIR	Spektrofotometri UV-Vis
Stimuno	66.828 ± 0,29	71.646 ± 0,02
Daun salam	42.425 ± 0,28	46.335 ± 0,03

Keterangan: Data disajikan sebagai rata-rata ± 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 fenol total sampel *training set* dan *test set* dengan metode spektrofotometri UV-Vis, diketahui ekstrak S mempunyai kadar fenol total tertinggi yaitu sebesar 241,633 mg GAE/g

ekstrak. Sedangkan kadar fenol total terendah yaitu ekstrak G sebesar 18,420 mg GAE/g ekstrak.

Pembentukan model kalibrasi dengan PLS dalam penelitian ini dibentuk dari 15 set kalibrasi (*training set*). Seluruh set kalibrasi telah diperoleh data absorbansi pada panjang gelombang 850-2000 nm. Parameter yang dipertimbangkan pada pemilihan model terbaik dalam PLS adalah berdasarkan nilai R^2 dan nilai RMSEC. Nilai R^2 adalah nilai korelasi dimana pemilihan model terbaik jika nilai korelasi yang diperoleh semakin besar dan nilai RMSEC dengan nilai yang paling rendah [13]. Nilai R^2 dan nilai RMSEC yang ditunjukkan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa model memiliki linieritas yang baik.

Model klasifikasi dalam penelitian ini dibuat dengan LDA. Kemampuan model dalam membedakan sampel yang mengandung fenol dengan sampel yang tidak mengandung fenol (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 digunakan untuk memprediksi atau memperkirakan seberapa akurat model prediksi yang dibuat untuk dapat diimplementasikan [14]. 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 validasi LOOCV untuk model yang terpilih menunjukkan nilai R^2 validasi yang baik. Nilai tersebut menunjukkan hubungan antara kadar fenol total dalam sampel *training set* yang sebenarnya dibandingkan dengan kadar yang diprediksi oleh model berdasarkan variabel respon dari metode pembandingan. Nilai R^2 dalam metode validasi ini mempunyai kemampuan yang baik dalam memprediksi konsentrasi dari sampel karena nilai R^2 yang terbentuk diatas 0,91 [15]. 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 mengklasifikasikan ke-5 sampel *training set* dengan benar.

Model PLS yang telah terbentuk dalam perangkat lunak The Unscrambler X 10.2 diterapkan dalam analisis kuantitatif sampel, yaitu untuk menentukan kadar sampel fenol total dengan metode spektroskopi NIR. Hasil penetapan kadar dengan menggunakan dua metode (Tabel 6) kemudian dihitung nilai signifikansi dan nilai t hitung nya menggunakan 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 0,296 dengan tingkat kepercayaan 95% dan t hitung sebesar $1,261 < t$ tabel 4,30265.

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% [16].

Simpulan dan Saran

Metode spektroskopi inframerah dekat (NIR) dan kemometrik dapat digunakan untuk menentukan kadar fenol total dan klasifikasi fenol dan matriks dalam beberapa ekstrak daun tanaman. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dibentuk model kalibrasi sampel tanaman untuk penentuan beberapa kandungan fitokimia secara simultan.

Daftar Pustaka

- [1] Tjitrosoepomo G. Morfologi tumbuhan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2005.
- [2] Cutter E. Plant anatomy: Experiment and interpretation part 2 organs. London: The English Language Society and Erward Arnold (Publishers) Ltd; 1989.
- [3] Kumar S, Pandey A. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Sci J. 2013
- [4] Vermerris W, Nicholson R. Phenolic compound biochemistry. Netherlands: Springer; 2006.
- [5] Gulcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Arch Toxicol. 2012; 86: 345-391.
- [6] Arina, Rohman. The phenolics contents and antiradical activity of Indonesian *Phyllanthus urinaria* L. IFRJ. 2013; 20 (3): 1119-1124.
- [7] Khoddami A, Wilkes M, Robert T. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. J Mol. 2013; 18: 2328-2375.
- [8] Rohman, Siswindari, Erwanto, Che Man. Analysis of pork adulteration in beef Meatball using Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy. J Meat Sci. 2011; 88: 91-95.
- [9] Karlinasari L, Sabed M, Wistara N, Purwanto A, Wijayanto H. Karakteristik spektra absorbansi NIR (Near Infrared) spektroskopi kayu *acacia mangium* Willd. pada 3 umur berbeda. JIK. 2012; VI: 1.
- [10] Ahuja S, Jespersen N. Comprehensive analytical chemistry. Elsevier. 2006: 47: 157-176.
- [11] Ritz V, Plevova. Application of infrared spectroscopy and chemometric methods to identification of selected minerals. Acta Geodyn Geomater. 2011; 8(161): 47-58.
- [12] Wolfe K, Wu X, Liu R. Antioxidant activity of apple peels. J Agr Food Chem. 2003: 51: 609-614
- [13] Baranska, W. Quality control of harpagophytum procumbens and its related phytopharmaceutical products by means of NIR-FT-Raman spectroscopy. Biopolymers. 2005: 77: 1-8.
- [14] Stchur P, Cleveland D, Zhou J, Michel R. A review of recent applications of near infrared spectroscopy and of the characteristics of novel Pbs CCD array based NIR spectrometers. Appl Spect Rev. 2002: 37: 383-428.
- [15] Lengkey L, Budiastira I, Seminar K, Purwoko B. Prediction model of moisture, fat and free fatty acid content of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seed using near infrared (NIR) spectroscopy and partial least square (PLS) method. J Littri. 2013; 19(4).
- [16] 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.