

ANALISIS RESIDU ETILEN GLIKOL MENGGUNAKAN *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA SEDIAAN SIRUP FLU DAN BATUK DI BEBERAPA APOTEK DI MAKASSAR



**ALIYAH SUKMA
N011191096**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**



ANALISIS RESIDU ETILEN GLIKOL MENGGUNAKAN *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA SEDIAAN SIRUP FLU DAN BATUK DI BEBERAPA APOTEK DI MAKASSAR

**ALIYAH SUKMA
N011191096**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

ANALISIS RESIDU ETILEN GLIKOL MENGGUNAKAN *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA SEDIAAN SIRUP FLU DAN BATUK DI BEBERAPA APOTEK DI MAKASSAR

ALIYAH SUKMA
N011191096

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI
ANALISIS RESIDU ETILEN GLIKOL MENGGUNAKAN *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA SEDIAAN SIRUP FLU DAN BATUK DI BEBERAPA APOTEK DI MAKASSAR

ALIYAH SUKMA
N011191096

Skripsi

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada 28 November 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan



Mengesahkan:
Pembimbing Utama,

Prof. Yusnita Rifai, S.Si.,
M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19751117 200012 2 001

Pembimbing Pendamping

Dr. Syaharuddin Kasim, M.Si.,
Apt.
NIP. 196330801 199003 1 001



Mengetahui,
Ketua Program Studi,

Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc, Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "ANALISIS RESIDU ETILEN GLIKOL MENGGUNAKAN *HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC) PADA SEDIAAN SIRUP FLU DAN BATUK DI BEBERAPA APOTEK DI MAKASSAR" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Prof. Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. dan Dr. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt.). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 28-11-2024



ALIAH SUKMA
N011191096

UCAPAN TERIMA KASIH

Selayaknya sebagai manusia yang sadar akan semua kekurangan dalam diri pribadi, tiada kata syukur dan ucapan terima kasih kepada Sang Maha Pencipta dan semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini. Oleh sebab itu, melalui ketikan ini, penulis ingin mempersembahkan ucapan terima kasih kepada Universitas Hasanuddin yang merupakan institusi tempat belajar dan berbagi pengalaman penulis dengan berbagai rupa manusia, kepada Prof. Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama yang tanpanya penelitian ini tidak akan pernah bisa terwujud dan Dr. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang dengan sabar telah meluangkan waktu, tenaga, ilmu serta arahan dalam penelitian ini.

Terima kasih juga kepada manusia-manusia yang telah turut andil dalam berbagi pikiran, mendukung, dan menghargai sepek terjang penulis dalam membebaskan diri dari belenggu standar sosial masyarakat, yaitu teman-teman asisten kimia 2019, dan teman-teman sejawat dalam organisasi (HIPERMAWA dan UKM Panahan Unhas).

Rasa syukur tiada akhir akan selalu menyertai perjalanan penulis dan berkat iringan doa dan ridho seorang Ibu-lah yang membuat penyusunan tugas akhir ini bisa terealisasikan. Kepada Bapak, tak ada yang selembut sikapmu, hanya lautan. Tak tergantikan, walau kita tak lagi saling menyapa.

Penulis,

Aliyah Sukma

ABSTRAK

ALIYAH SUKMA. **Analisis residu etilen glikol menggunakan *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada sediaan sirup flu dan batuk di beberapa apotek di makassar** (dibimbing oleh Yusnita Rifai dan Syaharuddin Kasim).

Latar belakang. Pada akhir tahun 2022, ditemukan kasus peningkatan kematian akibat gagal ginjal pada anak-anak di Gambia yang diduga terkait dengan konsumsi sirup batuk yang mengandung Etilen Glikol (EG) melebihi ambang batas aman. Kasus serupa terjadi di Indonesia, dengan tingkat kematian hingga 65% pada anak balita. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi residu EG pada sirup flu dan batuk yang beredar di beberapa apotek di Makassar menggunakan metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). **Metode.** Metode penelitian melibatkan pengambilan sampel dari berbagai apotek di Makassar, preparasi sampel, dan analisis menggunakan instrumen HPLC dengan detektor UV setelah dilakukan derivatisasi menggunakan benzoil klorida. **Hasil.** Kurva kalibrasi menunjukkan koefisien korelasi sebesar 0,992371, dengan batas deteksi 2,8427 ppm dan batas kuantitasi 8,6142 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh sampel yang diuji memiliki kadar EG yang memenuhi persyaratan batas aman yang ditentukan oleh regulasi yang berlaku. **Kesimpulan.** Kesimpulannya, metode HPLC yang digunakan cukup sensitif dan efektif dalam mendeteksi residu EG pada produk farmasi, meskipun disarankan pengembangan lebih lanjut untuk meningkatkan sensitivitas deteksi.

Kata Kunci : Etilen glikol, HPLC, sirup flu dan batuk, derivatisasi.

ABSTRACT

ALIYAH SUKMA. *Analysis of ethylene glycol residue using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) in flu and cough syrup preparations from several pharmacies in Makassar* (supervised by Yusnita Rifai and Syaharuddin Kasim).

Background. In late 2022, a significant increase in child mortality due to acute kidney failure was reported in Gambia, linked to the consumption of cough syrup containing Ethylene Glycol (EG) above safe limits. A similar situation occurred in Indonesia, with a mortality rate of up to 65% among young children. **Aim.** This study aims to detect and quantify EG residues in flu and cough syrups available in several pharmacies in Makassar using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Method.** The research involved sampling from various pharmacies in Makassar, sample preparation, and analysis using HPLC with a UV detector following derivatization with benzoyl chloride. **Results.** The calibration curve showed a correlation coefficient of 0.992371, with a detection limit of 2.8427 ppm and a quantification limit of 8.6142 ppm. The results indicated that all samples tested contained EG within the safe limits established by regulatory standards. **Conclusion.** In conclusion, the HPLC method used is sensitive and effective for detecting EG residues in pharmaceutical products. However, further development is recommended to enhance detection sensitivity.

Keywords: Ethylene glycol, HPLC, flu and cough syrup, derivatization.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
DAFTAR ISTILAH	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan penelitian	3
BAB II METODE PENELITIAN	4
II.1 Alat dan Bahan	4
II.2 Metode Kerja	4
BAB III HASIL	6
III.1 Linearitas	6
III.2 Nilai Batas Deteksi dan Kuantitasi	6
III.3 Parameter Kolom Kromatografi	7
III.4 Analisis Kuantitatif Residu EG dalam Sampel	7
BAB IV PEMBAHASAN	8
IV.1 Linearitas	9
IV.2 Nilai Batas Deteksi dan Kuantitasi	10
IV.3 Parameter Kolom Kromatografi	10
IV.4 Analisis Residu EG pada Sampel	11
BAB V KESIMPULAN	14
V.1 Kesimpulan	14

V.2	Saran.....	14
DAFTAR PUSTAKA.....		15
LAMPIRAN		20

DAFTAR TABEL

Nomor urut	halaman
1. Batas deteksi dan kuantitasi EGD.....	6
2. Parameter kolom kromatografi.....	7
3. Hasil analisis kadar EG dalam sampel metode HPLC.....	7
4. Waktu retensi beberapa senyawa poliol dari beberapa referensi.....	13

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	halaman
1. Kurva baku dari larutan standar EG terhadap konsentrasi dan luas area (AUC)	6
2. Struktur EG	8
3. Skema reaksi umum Schotten-Baumann	9
4. Reaksi antara benzoil klorida dan EG	9
5. Kromatogram baku konsentrasi 1 ppm.....	25
6. Kromatogram baku konsentrasi 10 ppm.....	25
7. Kromatogram baku konsentrasi 20 ppm.....	26
8. Kromatogram baku konsentrasi 30 ppm.....	26
9. Kromatogram baku konsentrasi 40 ppm.....	27
10. Kromatogram sampel A.....	27
11. Kromatogram sampel B.....	28
12. Kromatogram sampel C	28
13. Kromatogram sampel D	29
14. Kromatogram sampel E.....	29
15. Kromatogram sampel F.....	30
16. Kromatogram sampel G	31
17. Kromatogram sampel H	32
18. Kromatogram sampel I.....	32
19. Kromatogram sampel J.....	33
20. Kromatogram sampel K.....	34
21. Kromatogram sampel L.....	34

22. Kromatogram sampel M	35
23. Kromatogram sampel N	35
24. Kromatogram sampel O	36
25. Menimbang bahan.....	37
26. Penyiapan larutan baku.....	37
27. Sampel sirup flu dan batuk anak	37
28. Penyaringan larutan	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	halaman
1. Skema kerja umum	20
2. Perhitungan.....	22
3. Data Kromatogram	25
4. Dokumentasi penelitian	37
5. <i>Curriculum Vitae</i>	39

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti dan penjelasan
EG	Etilen Glikol
WHO	World Health Organization
GGAPA	Gagal Ginjal Akut Progresif Atipikal
AKI	Acute kidney injured
COM	Calcium oxalate monohydrate
CaOx	Calcium oxalate
Da	Dalton
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
RP-HPLC	Reversed Phase- High-Performance Liquid Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GC-FID	Gas Chromatography-Flame Ionization Detection
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared
DART-MS	Direct Analysis In Real Time-Mass Spectrometry
NaOH	Natrium hidroksida
WFI	Water for injection
mg/mL	Milligram per mililiter
µg/mL	Mikrogram per mililiter
µL	Mikroliter
v/v	Volume per volume
mm	Milimeter
mL/menit	Mililiter per menit
EGD	Etilen glikol derivatisasi
r	Koefisien korelasi
r ²	Koefisien determinasi
ppm	Part per million
Rs	Resolusi
N	Jumlah pelat teori
HETP	Height equivalent to a theoretical plate
FDA	Food and Drug Administration
i.d.	Inside diameter
µm	Mikrometer
pH	Potential of hydrogen
y	Luas area
a	Intercept
b	Slope
AUC	Area under curve
Sy	Simpangan baku
t _{R1}	Waktu retensi senyawa pertama
t _{R2}	Waktu retensi senyawa kedua
W ₁	Luas alas puncak pertama
W ₂	Luas alas puncak kedua
L	Panjang kolom

DAFTAR ISTILAH

Istilah	Arti dan Penjelasan
Morbiditas	tingkat yang sakit dan yang sehat dalam suatu populasi
Mortalitas	angka rata-rata kematian penduduk di suatu daerah atau wilayah
Hemodialisis	prosedur medis yang digunakan untuk menyaring dan membersihkan darah ketika ginjal tidak lagi mampu melakukannya dengan baik dengan menggunakan alat yang dinamakan ginjal buatan
Oksidasi	pelepasan elektron dari suatu partikel (molekul)
Radiasi	tenaga yang dipancarkan gelombang melalui ruang dan zantara; tenaga sinaran
Deteksi	konsentrasi terkecil dari suatu zat yang masih dapat dideteksi, tetapi belum tentu dapat diukur secara akurat dan kuantitatif
Kuantitasi	batas terendah suatu senyawa yang dapat dikuantifikasi secara tepat dan akurat oleh metode analisis yang digunakan, seperti HPLC
Matriks	media atau lingkungan tempat bahan aktif atau zat kimia lain terlarut, tersuspensi, atau terdistribusi dalam suatu sediaan obat
Residu	zat yang tertinggal atau tersisa dalam suatu produk farmasi setelah proses pembuatan atau pengolahan, bisa berupa zat yang tidak sepenuhnya dihilangkan dan berpotensi membahayakan keamanan dan kualitas produk jika kadarnya melebihi batas yang diizinkan
Linearitas	kemampuan suatu metode analisis untuk menunjukkan hubungan yang proporsional antara respon detektor dan konsentrasi analit dalam sampel
Derivatisasi	proses modifikasi struktur kimia suatu senyawa untuk mengubahnya menjadi senyawa lain yang lebih mudah dideteksi atau dianalisis
Resolusi	kemampuan untuk memisahkan dua puncak yang berdekatan dalam kromatogram, memberikan ukuran kuantitatif mengenai seberapa baik komponen-komponen campuran dibedakan satu sama lain
Kromofor	bagian molekul yang bertanggung jawab atas warnanya dengan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu. Istilah ini berasal dari kata Yunani "chroma," yang berarti warna, dan "phoros," yang berarti pembawa.
Eksipien	zat/bahan tambahan yang diformulasikan bersama bahan aktif farmasi dalam obat
Co-solvent	pelarut yang ditambahkan ke pelarut utama untuk meningkatkan kelarutan zat terlarut yang sulit larut dalam pelarut utama saja

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Pada akhir tahun 2022, sebanyak 69 anak-anak meninggal akibat penggunaan sirup batuk di Gambia. Diduga bahwa sirup tersebut mengandung senyawa yang melebihi ambang batas normal, terutama etilen glikol (EG) (Rajpurohit et al., 2022). Insiden ini mendorong *World Health Organization* (WHO) untuk merilis *Medical Product Alert No 6/2022* tentang *Substandard (contaminated) paediatric medicines identified in WHO region of Africa* (WHO, 2022) yang memperingatkan tentang peredaran empat obat substandard di wilayah Afrika, termasuk Gambia. Obat-obatan tersebut mengandung EG dengan konsentrasi yang melebihi batas, yang diduga berkaitan dengan peningkatan kasus gagal ginjal akut pada anak-anak di negara tersebut. Kasus serupa juga terjadi di Indonesia dimana dilaporkan adanya peningkatan kejadian Gangguan Gagal Ginjal Akut Progresif Atipikal (GGAPA) pada anak-anak balita. GGAPA ini diduga terkait dengan penggunaan obat-obatan yang mengandung kadar EG yang dengan tingkat kematian hingga 65% (BPOM, 2022).

EG telah lama dianggap sebagai zat berbahaya oleh berbagai lembaga kesehatan (Martinez et al., 2020) karena dapat menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang serius jika tertelan, terutama melalui keracunan yang berujung pada cedera ginjal akut (AKI) dan membutuhkan hemodialisis untuk mengembalikan fungsi ginjal. Penyebab cedera ginjal tidak diketahui, tetapi berhubungan dengan nekrosis sel tubular dan metabolisme EG yang menghasilkan asam oksalat, yang berkontribusi pada toksisitas ginjal melalui pengendapan kristal kalsium oksalat monohidrat (COM) di lumen tubulus (Seo et al., 2012). Selain itu, berdasarkan penelitian Baselt (2011) yang dikutip oleh Dziadozs (2018) bahwa EG dengan massa molekul 62 Da ini memiliki sifat fisik dan efek tidur (mirip dengan etanol) yang bertanggungjawab dalam penggunaan yang tidak disengaja atau sebagai minuman untuk bunuh diri, yang telah menyebabkan banyak keracunan pada tahun-tahun sebelumnya. Dosis fatal EG adalah 1 - 2 ml/kg, dengan kemungkinan kematian yang tinggi dalam waktu 24 jam karena mudah dan efisien diserap dalam sistem gastrointestinal dengan reaksi oksidasi yang cepat (Ghai et al., 2022) dan menghasilkan metabolit akhir berupa asam oksalat yang dapat bergabung dengan kalsium setelah paparan EG dosis tinggi untuk membentuk kristal kalsium oksalat, yang dapat mengendap di ginjal dan otak (Jacobsen dan Martin, 1986 dalam Carney et al., 1999; Megarbane, 2010). Hal ini sejalan dengan penelitian yang juga menunjukkan bahwa EG dapat menyebabkan gangguan pernapasan, kerusakan paru-paru, ginjal, serta hati. Hal ini dikonfirmasi dengan eksperimen hewan bahwa pengendapan kristal kalsium oksalat (CaOx) di ginjal dapat memicu pembentukan

batu ginjal (Sharma et al., 2017; Chen et al., 2011; Liu et al., 2018 dalam Wexler, 2024).

Meskipun BPOM telah menarik obat sirup yang telah terbukti mengandung EG yang melebihi ambang batas normal (BPOM, 2022), masih terdapat kemungkinan produk-produk obat sirup yang belum diselidiki secara tuntas, khususnya di Makassar, Sulawesi Selatan. EG relatif tidak berbahaya dan utamanya dapat menyebabkan depresi sistem saraf pusat. Namun, EG dioksidasi menjadi produk beracun seperti asam glikolat, glioksilat dan oksalat (Whalen et al., 2019). Hal yang perlu diperhatikan disini adalah EG tidak terdeteksi oleh radiasi UV, maka dari itu dilakukan derivatisasi EG dengan benzoil klorida berdasarkan reaksi Schotten-Baumann dan *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) (Martinez et al., 2020).

Dengan demikian, deteksi dan kuantitasi EG pada sirup flu dan batuk menjadi penting karena dapat berdampak pada keamanan dan efikasi sediaan tersebut. Penentuan EG dalam produk farmasetik telah banyak dilakukan diantaranya menggunakan *gas chromatography coupled to mass spectrometry* (GC-MS) (Fu et al., 2011), *gas chromatography with flame ionization detection* (GC-FID) (Holloway et al., 2010), *attenuated total reflection fourier transform infrared* (ATR-FTIR) *spectroscopy* (Lopez et al., 2008), dan *direct analysis in real time-mass spectrometry* (DART-MS) (Self, 2013). Beberapa teknik analisis tersebut telah dijelaskan dalam literatur untuk analisis toksik glikol dalam matriks yang berbeda dan berdasarkan sifat fisika-kimia senyawa ini, maka teknik analisis yang sangat direkomendasikan adalah GC-MS (Caldeira et al., 2021) dan BPOM telah merilis teknik analisis yang sama sebagai metode dalam analisis uji cemaran EG.

Namun, penentuan dengan teknik tersebut sulit dilakukan karena memakan biaya yang mahal (Lopez-Sanchez et al., 2008) dan tidak adanya ketersediaan alat tersebut di laboratorium. Mengacu pada hal tersebut, peneliti memilih menggunakan *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang mempunyai sensitivitas yang lebih baik daripada GC-MS (Martinez et al., 2020) yang tersedia di laboratorium dan menggunakan metode ini untuk deteksi dan kuantitasi EG dalam sirup flu dan batuk (Martinez et al., 2020).

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka peneliti melakukan analisis residu EG pada sirup flu dan batuk yang beredar di beberapa apotek di Makassar menggunakan *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan rumusan masalah sebagai berikut.

- I.1.1 Apakah metode analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dapat mendeteksi residu EG pada sirup flu dan batuk yang beredar di beberapa apotek di Makassar?
- I.1.2 Apakah sirup flu dan batuk tersebut mengandung EG dalam batas yang dapat diterima?

I.2 Tujuan penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini terdiri atas:

- I.3.1 Untuk menentukan apakah metode analisis *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dapat digunakan untuk mendeteksi residu EG dalam sirup flu dan batuk yang beredar di beberapa apotek di Makassar
- I.3.2 Untuk menentukan apakah kandungan residu EG pada sirup flu dan batuk yang dianalisis berada dalam batas yang dapat diterima atau tidak

BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini alat-alat yang dibutuhkan yaitu alat-alat gelas (Pyrex[®]), instrumen HPLC (Shimadzu), pipet mikro (VITLAB[®]), *microtube* (Effendorf), timbangan analitik (Fujitsu FS-AR), dan vortex (DLAB MX-S).

Bahan-bahan yang dibutuhkan yaitu benzil alkohol (Emsure[®]), benzoil klorida (Merck-Schuchardt), etilen glikol (*purity* 99,8%), glisin (Merck), metanol (*LC-grade*), natrium hidroksida (NaOH), *n*-heptana (Merck), *syringe filter nylon* 25 mm 0,22 μm , dan *Water for Injection* (WFI).

II.2 Metode Kerja

II.2.1 Pengambilan Sampel

Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah sirup flu dan batuk untuk anak. Sebanyak 15 sampel dengan merek yang berbeda dikumpulkan dari beberapa Apotek di Makassar yang terdiri atas 8 sampel yang mengandung parasetamol dan 7 sampel yang tidak mengandung parasetamol.

II.2.2 Pembuatan Kurva Baku

EG dilarutkan dalam aquades sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL (larutan stok). Larutan stok diencerkan menjadi 5, 10, 20, 30, dan 40 $\mu\text{g/mL}$. Dicuplik 50 μL setiap konsentrasi ke dalam *microtube* dan ditambahkan internal standar berupa benzil alkohol 15 ppm sebanyak 50 μL ke dalam tiap tabung. Kemudian, ditambahkan 200 μL NaOH 40% dan benzoil klorida sebanyak 20 μL . Divortex selama 2 menit. Setelah itu, ditambahkan 50 μL larutan glisin 10% dan diikuti dengan 1 mL *n*-heptana. Divortex lagi selama 3 menit. Diambil supernatan, disaring dan ditambahkan 500 μL fase gerak yang terdiri dari campuran metanol dan air (70:30% v/v) kemudian diinjeksikan ke sistem HPLC (Nanco et al., 2019).

II.2.3 Analisis residu EG dalam sirup flu dan batuk

Setiap sampel dipipet sebanyak 50 μL menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam *microtube*, ditambahkan benzil alkohol 15 ppm sebanyak 50 μL diikuti dengan penambahan NaOH 40% sebanyak 200 μL . Setelah itu, ditambahkan benzoil klorida sebanyak 20 μL pada tiap sampel. Divortex selama 2 menit. Untuk mengakhiri reaksi, ditambahkan larutan glisin 10% sebanyak 50 μL . Kemudian ditambahkan 1 mL *n*-heptana sebanyak 1 mL dan divortex selama 3 menit. Diambil supernatan, disaring, dan ditambahkan masing-masing 500 μL fase gerak yang terdiri dari campuran metanol dan air (70:30% v/v) (Nanco et al., 2019). Setelah itu, setiap sampel

diinjeksikan ke sistem HPLC yang dilengkapi dengan detektor UV dengan kolom Shim-pack GIST C18-AQ (5 μm , 4,6 mm \times 250 mm). Analisis dilakukan dengan menginjeksikan larutan sebanyak 10 μL pada instrumen dengan laju alir 0,8 mL/menit. Fase gerak berupa metanol dan air dengan perbandingan 70:30% (v/v) dan temperatur kolom diatur pada 40°C dengan *running time* selama 20 menit (Martinez et al., 2020; Nanco et al., 2019).

II.2.4 Analisis data dan penarikan kesimpulan

Data hasil penelitian yang diperoleh dikumpulkan dan diolah. Pengolahan data dan analisis statistik menggunakan aplikasi Microsoft Excel[®]. Berdasarkan data hasil analisis, ditarik sebuah kesimpulan.