

**VALIDASI METODE *HIGH-PERFORMANCE LIQUID*  
*CHROMATOGRAPHY* FASE TERBALIK PADA PENETAPAN KADAR  
NIKOTIN DALAM CAIRAN ROKOK ELEKTRIK MEREK “X”**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)  
Program Studi Farmasi



Oleh:

Ricky Davita Sutanto

NIM : 158114099

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SANATA DHARMA  
YOGYAKARTA  
2019**

**VALIDASI METODE *HIGH-PERFORMANCE LIQUID*  
*CHROMATOGRAPHY* FASE TERBALIK PADA PENETAPAN KADAR  
NIKOTIN DALAM CAIRAN ROKOK ELEKTRIK MEREK “X”**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)  
Program Studi Farmasi



Oleh:

Ricky Davita Sutanto

NIM : 158114099

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SANATA DHARMA  
YOGYAKARTA  
2019**

**Persetujuan Pembimbing**

**VALIDASI METODE *HIGH-PERFORMANCE LIQUID*  
CHROMATOGRAPHY FASE TERBALIK PADA PENETAPAN KADAR  
NIKOTIN DALAM CAIRAN ROKOK ELEKTRIK MEREK "X"**

Skripsi yang diajukan oleh:

Ricky Davita Sutanto

NIM : 158114099

telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama



Dr. Christine Patramurti, Apt.

tanggal 3 Januari 2019

Pengesahan Skripsi Berjudul  
**VALIDASI METODE *HIGH-PERFORMANCE LIQUID*  
*CHROMATOGRAPHY* FASE TERBALIK PADA PENETAPAN KADAR  
NIKOTIN DALAM CAIRAN ROKOK ELEKTRIK MEREK "X"**

Oleh:

Ricky Davita Sutanto

NIM: 158114099

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

pada tanggal 16 Januari 2019

Mengetahui

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

Dekan



Dr. Yustina Sri Hartini, M.Si., Apt.

Panitia Penguji:

1. Dr. Christine Patramurti, Apt.
2. Maywan Hariono, Ph.D., Apt.
3. Michael Raharja Gani, M.Farm., Apt.

Penguji 1

Penguji 2

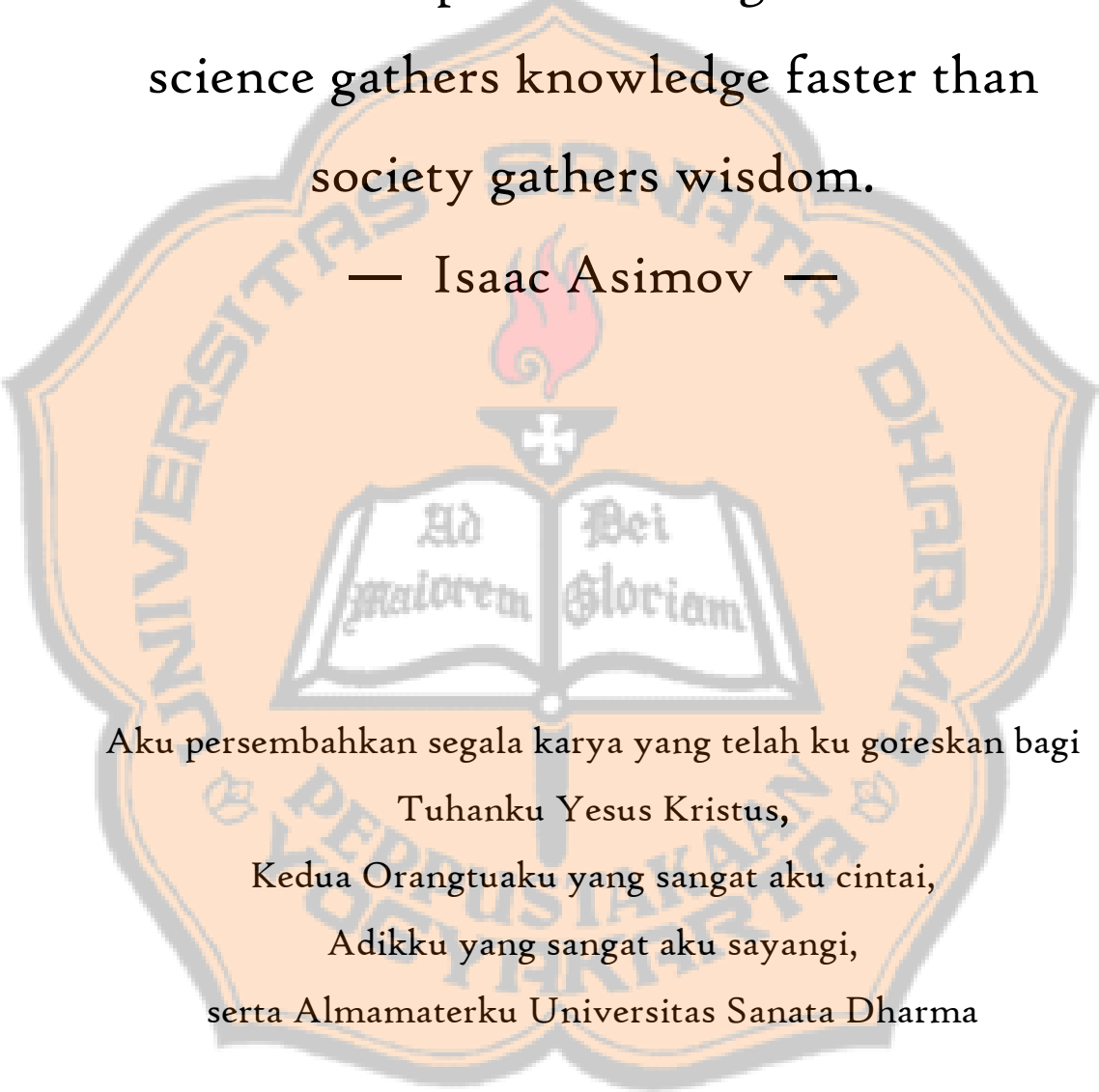
Penguji 3

Tanda tangan

HALAMAN PERSEMBAHAN

The saddest aspect of life right now is that  
science gathers knowledge faster than  
society gathers wisdom.

— Isaac Asimov —



Aku persembahkan segala karya yang telah ku goreskan bagi  
Tuhanku Yesus Kristus,  
Kedua Orangtuaku yang sangat aku cintai,  
Adikku yang sangat aku sayangi,  
serta Almamaterku Universitas Sanata Dharma

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

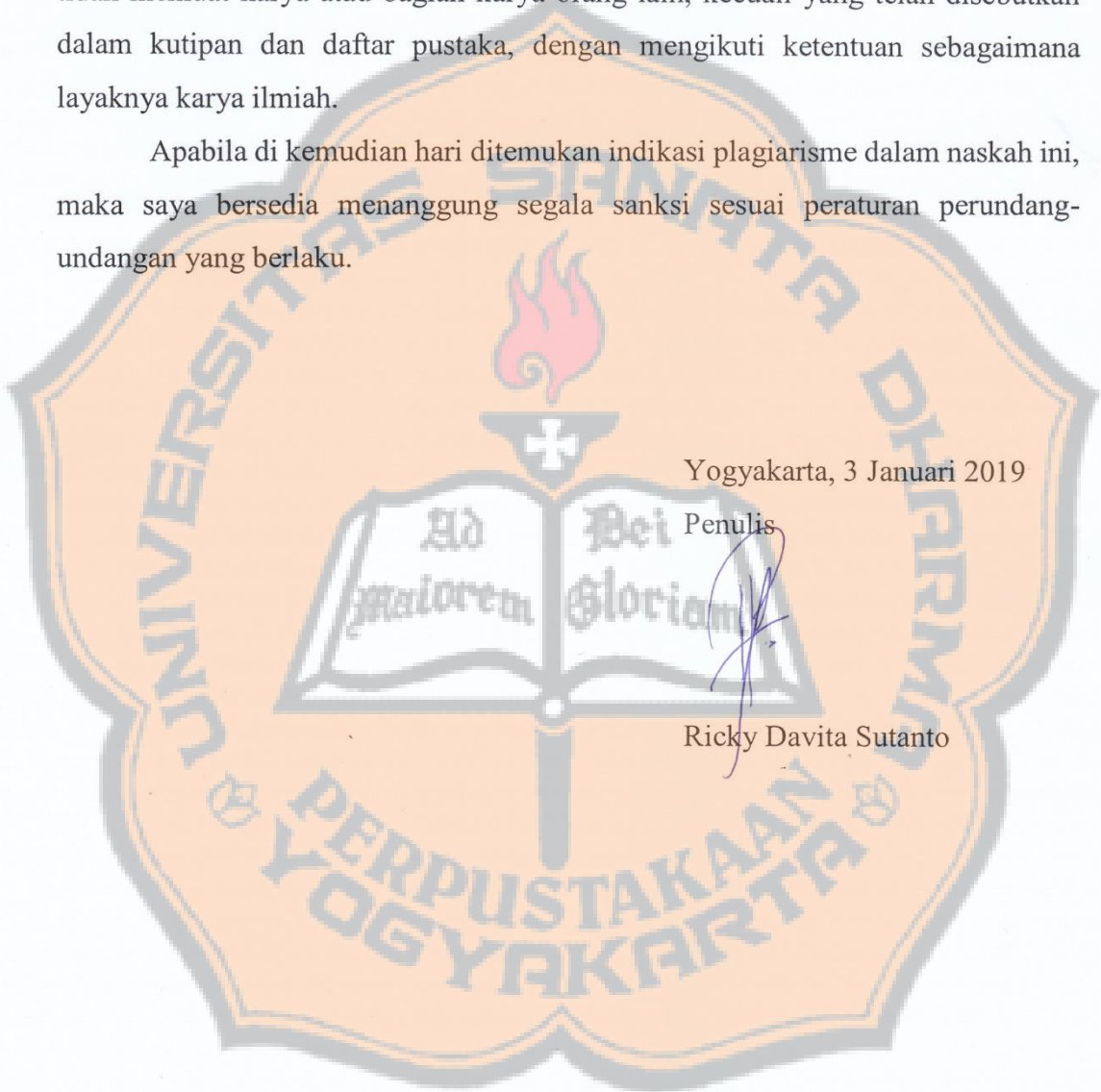
Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini tidak memuat karya atau bagian karya orang lain, kecuali yang telah disebutkan dalam kutipan dan daftar pustaka, dengan mengikuti ketentuan sebagaimana layaknya karya ilmiah.

Apabila di kemudian hari ditemukan indikasi plagiarisme dalam naskah ini, maka saya bersedia menanggung segala sanksi sesuai peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Yogyakarta, 3 Januari 2019

Penulis

Ricky Davita Sutanto





**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH  
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini, mahasiswa Universitas Sanata Dharma:

Nama : Ricky Davita Sutanto

Nomor Mahasiswa : 158114099

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma karya ilmiah saya yang berjudul:

**VALIDASI METODE *HIGH-PERFORMANCE LIQUID*  
*CHROMATOGRAPHY* FASE TERBALIK PADA PENETAPAN KADAR  
NIKOTIN DALAM CAIRAN ROKOK ELEKTRIK MEREK "X"**

Beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan demikian saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma hak untuk menyimpan, mengalihkan dalam bentuk media lain, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data, mendistribusikan secara terbatas, dan mempublikasikannya di internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta izin dari saya maupun memberikan *royalty* kepada saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Yogyakarta

Pada tanggal : 3 Januari 2019

Yang menyatakan,



Ricky Davita Sutanto

## PRAKATA

Puji dan Syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas kesehatan dan penyertaan-Nya hingga hari ini, sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul *Validasi Metode High-Performance Liquid Chromatography Fase Terbalik pada Penetapan Kadar Nikotin dalam Cairan Rokok Elektrik Merek "X"* sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.) di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.

Dukungan dan bantuan dari berbagai pihak selalu menyertai perjalanan penulis dalam menyusun naskah skripsi ini, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Yustina Sri Hartini, Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
2. Ibu Dr. Christine Patramurti, Apt., selaku Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma dan selaku dosen pembimbing, dosen penguji, serta orang tua kedua yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, perhatian, motivasi, kritik, dan saran sejak awal dimulainya penelitian hingga selesainya skripsi ini.
3. Bapak Maywan Hariono, Ph.D., Apt., selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan ilmu, arahan, kritik, dan saran yang membangun.
4. Bapak Michael Raharja Gani, M.Farm., Apt., selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan ilmu, arahan, kritik, dan saran yang membangun.
5. Bapak Christianus Heru Setiawan, M.Sc., Apt., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan motivasi dan saran sejak awal masuk perkuliahan.
6. Mas Bimo (Laboran Laboratorium Kimia Instrumental), Pak Parlan (Laboran Laboratorium Kimia Organik, dan Mas Ketul (Karyawan laboratorium lantai 4).



7. Mama ku, Papa ku, dan adik ku yang selalu memberikan dukungan, cinta kasih, semangat dan menjagaku di setiap waktu dan setiap langkah yang aku ambil.
8. Rekan penelitian “Kesayangan Ibu” Stefanus Sofian Arissaputra dan Yohanes Willy Agusta yang telah berjuang bersama dari titik awal penelitian ini, melewati suka-duka di setiap hari-hari lembur di laboratorium.
9. Sahabat “Pethodon” yang telah ku kenal sejak awal perkuliahan, yang selalu mendukung dalam suka maupun duka perkuliahan hingga menjadi keluarga terdekatku di masa perkuliahan.
10. Teman-teman FSM C 2015 serta Angkatan 2015 Farmasi Universitas Sanata Dharma yang telah memberikan banyak doa dan semangat dalam menyelesaikan naskah ini.
11. Pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa terdapat banyak kekurangan dalam penulisan naskah skripsi ini. Penulis berharap masukan kritik serta saran yang dapat membangun dari semua pihak agar dapat lebih baik lagi. Akhir kata, semoga dengan adanya skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi pembaca dan pihak yang membutuhkan.

Yogyakarta, 3 Januari 2019

Penulis

## INTISARI

Rokok elektrik adalah perangkat rokok yang digunakan dengan cara memanaskan cairan yang menghasilkan asap dan dihisap oleh pemakainya yang termasuk cairan nikotin dan pengganti likuid nikotin yang digunakan sebagai isi mesin dan aparatus elektrik. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109 Tahun 2012 tentang pengamanan bahan yang mengandung zat adiktif berupa produk tembakau bagi kesehatan pasal 19, menyebutkan bahwa setiap orang yang memproduksi dan/atau mengimpor produk tembakau wajib mencantumkan informasi kandungan kadar nikotin sesuai hasil pengujian yang dilakukan di laboratorium yang sudah terakreditasi.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode HPLC pada penetapan kadar nikotin yang terkandung dalam cairan rokok elektrik. Sistem HPLC yang digunakan yaitu HPLC fase terbalik dengan fase gerak metanol : ammonium asetat (70:30), laju alir 1,0 mL/menit serta fase diam C-18 dengan detektor UV pada panjang gelombang 261 nm.

Hasil validasi metode yang dihasilkan memenuhi parameter parameter validasi. Analisis paling baik dilakukan pada konsentrasi nikotin 750 ng/mL, konsentrasi tersebut juga dipilih untuk mencegah terjadinya ekstrapolasi akibat kecilnya konsentrasi nikotin. Waktu retensi pada konsentrasi 750,0 ng/mL yaitu pada menit ke 4,161; nilai *tailing factor* sebesar 1,499; nilai resolusi sebesar 1,725; nilai recovery sebesar 97,241%; dan CV sebesar 1,688%.

**Kata kunci** : Validasi, HPLC Fase Terbalik, Nikotin, Rokok Elektrik

## ABSTRACT

*Electric cigarette is a cigarette device that is used by heating liquids that produce smoke and being inhaled by the user, including liquid nicotine and a liquid substitute for nicotine which is used as the substituent of machines and electrical apparatus. Republic of Indonesia Government Regulation No. 109 of 2012 concerning safeguarding of materials containing addictive substances in the form of tobacco products for health article 19, states that everyone who produces and / or imports tobacco products must provide information on content of nicotine according to the results of tests carried out in laboratories accredited.*

*This study aims to validate the HPLC method on the determination of nicotine levels which is contained in e-cigarette liquids. The used HPLC system is reverse phase HPLC with the mobile phase of methanol: ammonium acetate (70:30), flow rate of 1.0 mL / minute and stationary phase C-18 with UV detector at 261 nm.*

*The results demonstrate that the HPLC protocol meets the parameters validation criterians. The most valid method analysis is carried out at a nicotine with concentration of 750 ng / mL. This concentration is also selected to prevent extrapolation caused by small nicotine concentration. Retention time at a concentration of 750.0 ng / mL, which is at 4.161 minutes; tailing factor value at 1.499; resolution value at 1.725; recovery value at 97.241%; and CV at 1.688%.*

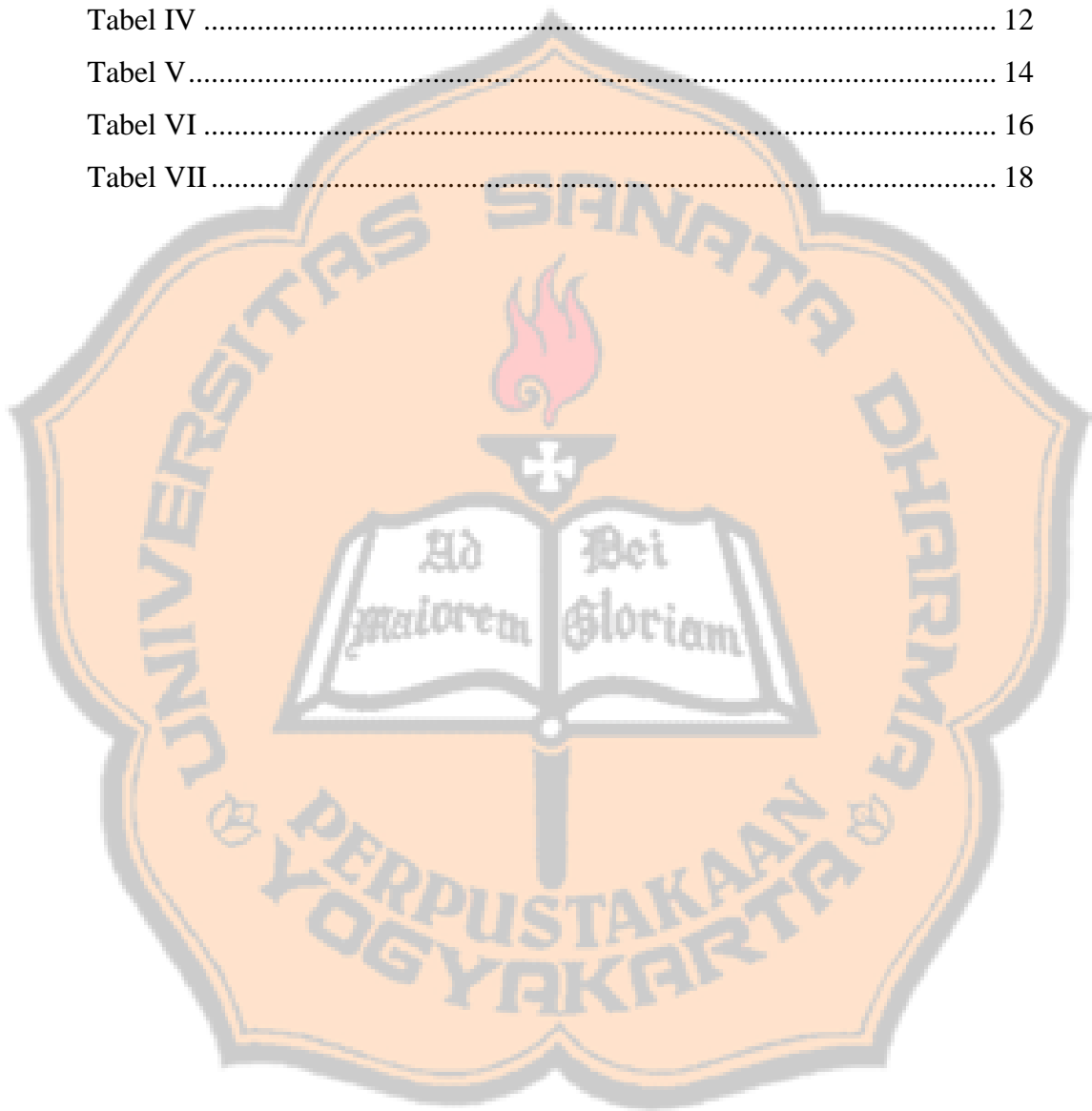
**Keywords:** *Validation, Reverse Phase HPLC, Nicotine, Electric Cigarette*

**DAFTAR ISI**

|  | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL.....                     | i       |
| HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING .....   | ii      |
| PENGESAHAN .....                       | iii     |
| PERSEMBAHAN .....                      | iv      |
| PERNYATAAN KEASLIAN KARYA .....        | v       |
| PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI ..... | vi      |
| PRAKATA .....                          | vii     |
| INTISARI .....                         | ix      |
| <i>ABSTRACT</i> .....                  | x       |
| DAFTAR ISI .....                       | xi      |
| DAFTAR TABEL .....                     | xii     |
| DAFTAR GAMBAR .....                    | xiii    |
| DAFTAR LAMPIRAN .....                  | xiv     |
| PENDAHULUAN .....                      | 1       |
| METODE PENELITIAN .....                | 2       |
| HASIL DAN PEMBAHASAN .....             | 7       |
| KESIMPULAN .....                       | 19      |
| SARAN .....                            | 19      |
| DAFTAR PUSTAKA .....                   | 20      |
| LAMPIRAN .....                         | 21      |
| BIOGRAFI PENULIS .....                 | 43      |

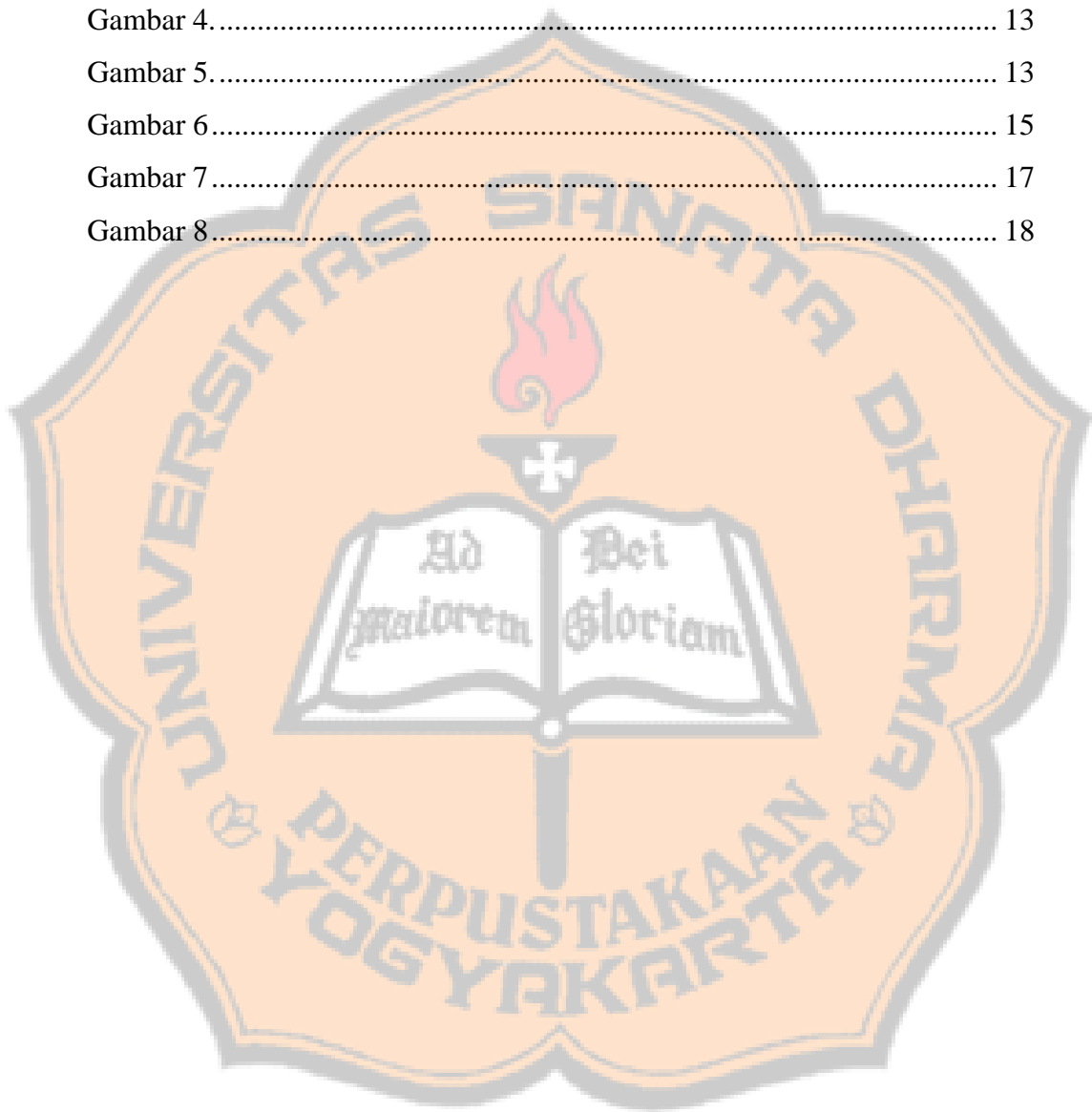
**DAFTAR TABEL**

|                |    |
|----------------|----|
| Tabel I.....   | 10 |
| Tabel II.....  | 11 |
| Tabel III..... | 11 |
| Tabel IV ..... | 12 |
| Tabel V.....   | 14 |
| Tabel VI ..... | 16 |
| Tabel VII..... | 18 |



**DAFTAR GAMBAR**

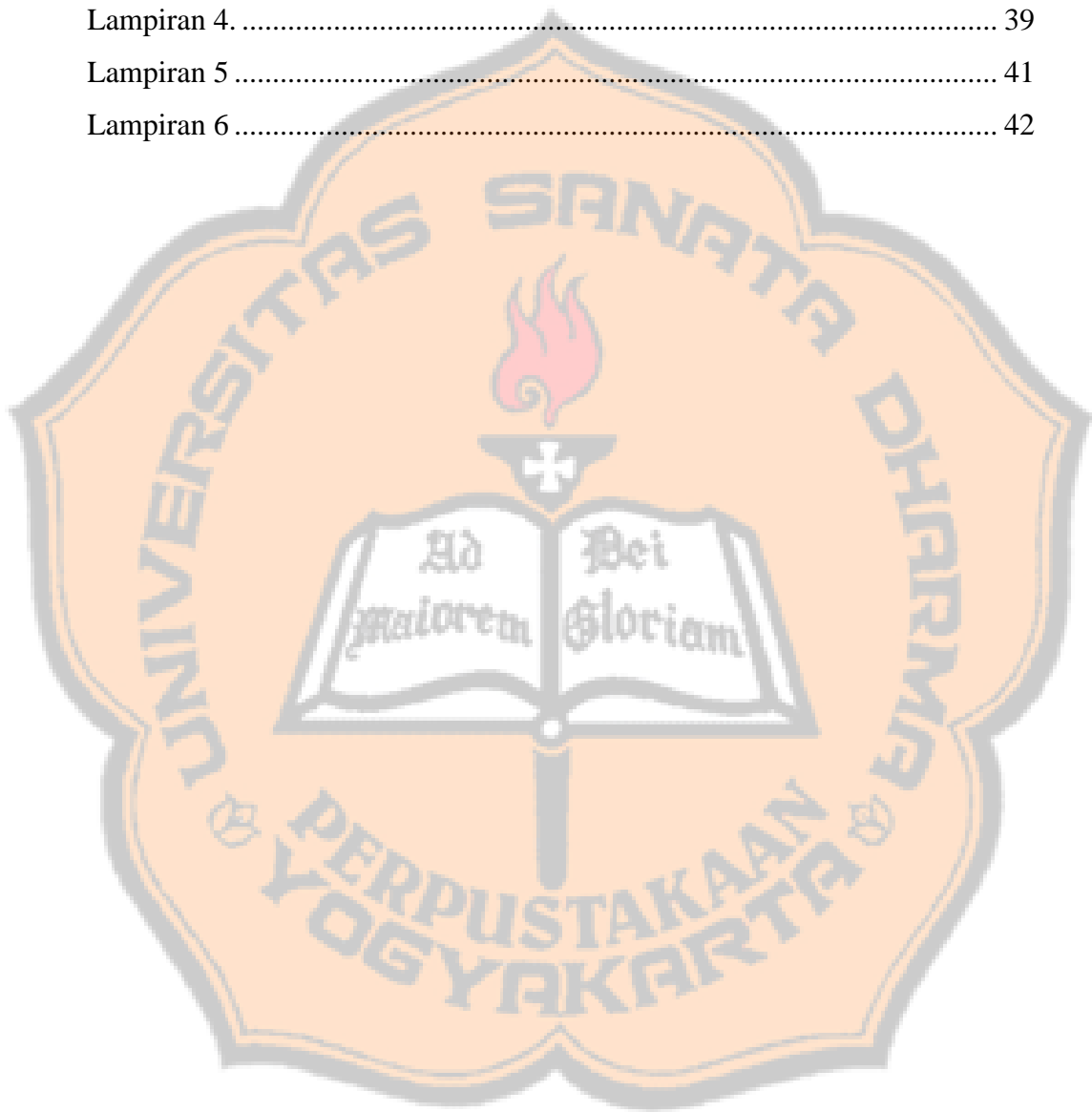
Gambar 1..... 8  
Gambar 2..... 8  
Gambar 3..... 9  
Gambar 4..... 13  
Gambar 5..... 13  
Gambar 6..... 15  
Gambar 7..... 17  
Gambar 8..... 18





**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1..... 21  
Lampiran 2..... 33  
Lampiran 3..... 37  
Lampiran 4..... 39  
Lampiran 5..... 41  
Lampiran 6..... 42



## PENDAHULUAN

Rokok elektrik adalah perangkat rokok yang digunakan dengan cara memanaskan cairan yang menghasilkan asap dan dihisap oleh pemakainya yang termasuk likuid nikotin dan pengganti likuid nikotin yang digunakan sebagai isi mesin dan apparatus elektrik (Kemendagri, 2017). Penggunaan rokok elektrik telah berkembang pesat di seluruh dunia terutama di Indonesia. Popularitas rokok elektrik terus meningkat karena gencarnya pemasaran, terdapat banyak varian rasa, adanya persepsi bahwa rokok elektrik lebih aman dibandingkan dengan rokok konvensional, dan kadar nikotin yang dapat diatur sesuai keinginan (Talih, 2014).

Jumlah perokok elektrik di dunia terus meningkat setiap tahunnya, hal ini disebabkan oleh kecanduan terhadap rokok elektrik sehingga perokok susah untuk berhenti merokok. Zat yang dapat menyebabkan kecanduan pada rokok elektrik adalah nikotin yang terkandung dalam cairan rokok elektrik. Nikotin merupakan alkaloid piridin pada daun tembakau yang memiliki gugus piridin dan cincin pirrolidin (Popl *et al.*, 1990). Nikotin larut dalam air di bawah 60°C, sangat larut dalam alkohol, kloroform, eter, petroleum eter, kerosen, dan minyak. Nikotin tidak memiliki warna tetapi dapat berubah warna menjadi coklat apabila terkena udara atau cahaya. Nikotin sangat higroskopik, memiliki rasa bakaran dan memiliki aroma piridin (O'Neil *et al.*, 2001). Nikotin memiliki titik didih 246-247°C, bobot molekul 162,23; massa jenis 1,0097 g/mL, pKa 4,23 dan 9,13; dan logP 0,93 (Domino, 1999).

Peraturan Menteri Keuangan Nomor 146/PMK.010/2017 Tahun 2017 tentang Tarif Cukai Hasil Tembakau, menyebutkan bahwa rokok elektrik digolongkan dalam Hasil Pengolahan Tembakau Lainnya (HPTL) dan dikenakan cukai sebesar 57%. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109 Tahun 2012 tentang Pengamanan Bahan yang Mengandung Zat Adiktif Berupa Produk Tembakau Bagi Kesehatan Pasal 19, menyebutkan bahwa setiap orang yang memproduksi dan/atau mengimpor Produk Tembakau wajib mencantumkan informasi kandungan kadar nikotin sesuai hasil pengujian yang dilakukan di laboratorium yang sudah terakreditasi sesuai dengan ketentuan peraturan

perundang-undangan pada label setiap kemasan dengan penempatan yang jelas dan mudah dibaca (PP RI, 2012).

Untuk memastikan kadar nikotin yang terkandung dalam cairan rokok elektrik sudah sesuai dengan kadar nikotin yang tercantum dalam label kemasan, maka perlu dilakukan penetapan kadar nikotin dalam cairan rokok elektrik tersebut. Diperlukan metode yang valid untuk menetapkan kadar nikotin tersebut, sehingga hasilnya dapat dipertanggungjawabkan. Analisis nikotin dapat dilakukan menggunakan HPLC fase terbalik yang terdiri dari fase gerak yang bersifat lebih polar daripada fase diamnya (Snyder *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian terdahulu oleh Sumitro (2013), penetapan kadar nikotin dalam rokok dapat dilakukan dengan metode HPLC fase terbalik. Sumitro melakukan analisis nikotin dalam ekstrak tembakau rokok dengan komposisi fase gerak metanol : ammonium asetat 10 mM yang mengandung TEA 0,1 % dengan fase diam C<sub>8</sub> (Sumitro, 2013). Penelitian ini mengacu pada penelitian Sumitro dengan melakukan modifikasi metode dengan mengubah fase diamnya dari semula C<sub>8</sub> menjadi C<sub>18</sub>. Metode HPLC dipilih karena metode ini memiliki waktu analisis yang cepat, peka, daya pisah yang baik, pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk menganalisis molekul besar dan kecil, dan dapat digunakan untuk menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (Harmita, 2015).

Penulis melakukan validasi metode HPLC fase terbalik pada penetapan kadar nikotin dalam cairan rokok elektrik merek "X" pada penelitian ini. Validasi metode perlu dilakukan guna memastikan metode HPLC telah memiliki metode yang optimal dan memiliki validitas yang baik sehingga hasil yang diperoleh dapat dipercaya dan dipertanggungjawabkan sehingga dapat digunakan untuk menetapkan kadar nikotin dalam cairan rokok elektrik merek "X".

## **METODE PENELITIAN**

### **Bahan**

Sampel cairan rokok elektrik merek "X", metanol *pro analysis* (E.Merck), aquades dan aquabides, baku nikotin (E.Merck), ammonium asetat (E.Merck),

propilen glikol teknis dan gliserol teknis. Bahan yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Kimia Analisis Instrumen Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.

### **Instrumentasi**

HPLC dengan detektor UV (LC-2010C *shimadzu*), kolom C18 dengan dimensi 250 x 4,6 mm dan ukuran pori 5  $\mu\text{m}$  (*Phenomenex*®), seperangkat komputer (*Dell*) B6RDZIS *Connexant system* RD01-D850 A03-0382 JP France S.A.S, Spektrofotometer UV-VIS tipe UV Mini-1240 merek *Shimadzu*, printer merek *HP Deskjet* 1000 J110a, ultrasonikator merek *retsch*, timbangan analitis *scaltec* (*max* 60/210g, *min* 0,001 g; d = 0,01/0,1 mg), jarum suntik (*terumo*), *syringe filter* 0,45  $\mu\text{m}$  (*Minisart*®), penyaring *Whatman* 0,45  $\mu\text{m}$ , *microsentrifugator* (*Thermo scientific Heraeus Pico*), alat vakum GAST (*Merck*), corong *Buchner*, pompa vakum, corong pisah, *glass firm*, peralatan-peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium analisis.

### **Tata Cara Penelitian**

#### **Pembuatan Fase Gerak**

Fase gerak yang digunakan adalah metanol : ammonium asetat 10 mM. Sebanyak kurang lebih 0,7708 gram ammonium asetat (BM = 77,08) ditimbang dengan saksama, dimasukkan ke dalam labu takar 1000 mL dan ditambahkan aquabidest hingga batas tanda, sehingga diperoleh larutan ammonium asetat 10,0 mM. Masing-masing larutan disaring menggunakan kertas saring *Whatman* yang dibantu dengan pompa vakum dan diawaudarakan selama 15 menit. Pencampuran fase gerak dilakukan di dalam sistem HPLC dengan komposisi metanol : ammonium asetat 10,0 mM dengan perbandingan 70:30.

#### **Pembuatan Larutan Stok Nikotin**

Larutan stok dibuat dengan cara mengambil 10,0  $\mu\text{L}$  baku nikotin ( $\rho = 1,0097 \text{ g/mL}$ ) dan dilarutkan dengan fase gerak dalam labu takar 100 mL, sehingga diperoleh larutan stok nikotin 100,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Pengamatan Spektra Nikotin**

Larutan stok nikotin dengan konsentrasi 100,0  $\mu\text{g/mL}$  diambil sebanyak 500,0; 750,0; 1000,0  $\mu\text{L}$  lalu dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan fase gerak hingga batas tanda, sehingga diperoleh konsentrasi 10,0;

15,0; dan 20,0  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan yang diperoleh dibaca absorbansinya pada daerah panjang gelombang 200–400 nm menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Panjang gelombang maksimum pengamatan ditentukan berdasarkan spektra dengan serapan yang maksimal.

#### **Preparasi Larutan Simulasi Sampel (2,0 $\mu\text{g/mL}$ )**

Sebanyak 100,0  $\mu\text{L}$  baku nikotin 1 mg/mL ( $\rho = 1,0097 \text{ g/mL}$ ) diambil dan dicampurkan dengan 70,0 mL larutan propilen glikol ke dalam labu takar 100 mL lalu ditambahkan dengan larutan gliserol hingga batas tanda, sehingga diperoleh larutan simulasi sampel dengan konsentrasi nikotin 1,0 mg/mL. Larutan sampel tersebut kemudian diencerkan kembali dengan cara mengambil 500,0  $\mu\text{L}$  larutan simulasi sampel 1,0 mg/mL tersebut dan dicampurkan dengan fase gerak dalam labu takar 10 mL, sehingga diperoleh larutan simulasi sampel dengan konsentrasi nikotin 50,0  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan sampel tersebut kemudian diencerkan kembali dengan cara mengambil 1,0 mL larutan simulasi sampel 50,0  $\mu\text{g/mL}$  tersebut dan dilarutkan dengan fase gerak dalam labu takar 25 mL, sehingga diperoleh larutan simulasi sampel dengan konsentrasi 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Pembuatan Larutan Intermediet Nikotin (10,0 $\mu\text{g/mL}$ )**

Sebanyak 2,00 mL larutan simulasi sampel dengan konsentrasi 50,0  $\mu\text{g/mL}$  diambil dan dilarutkan dengan fase gerak dalam labu takar 10 mL hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan intermediet nikotin 10,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Pembuatan Larutan Intermediet Nikotin (1,0 $\mu\text{g/mL}$ )**

Sebanyak 5,0 mL larutan simulasi sampel dengan konsentrasi 2,0  $\mu\text{g/mL}$  diambil dan dilarutkan dengan fase gerak dalam labu takar 10 mL hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan intermediet nikotin 1,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Preparasi Seri Kurva Baku**

Sebanyak 25,0  $\mu\text{L}$ ; 50,0  $\mu\text{L}$ ; 75,0  $\mu\text{L}$  larutan intermediet nikotin 1,0  $\mu\text{g/mL}$  diambil dan sebanyak 10,0  $\mu\text{L}$ ; 25,0  $\mu\text{L}$ ; 50,0  $\mu\text{L}$ ; 75,0  $\mu\text{L}$ ; 100,0  $\mu\text{L}$ ; 125,0  $\mu\text{L}$ ; 150,0  $\mu\text{L}$ ; 175,0  $\mu\text{L}$ ; 200,0  $\mu\text{L}$  intermediet nikotin 10,0  $\mu\text{g/mL}$  diambil, kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 2 mL. Fase gerak ditambahkan ke dalam masing-masing *microtube* sampai 1,0 mL, sehingga diperoleh larutan nikotin dengan konsentrasi 25,0 ng/mL; 50,0 ng/mL; 75,0 ng/mL; 100,0 ng/mL; 250,0

ng/mL; 500,0 ng/mL; 750,0 ng/mL; 1000,0 ng/mL; 1250,0 ng/mL; 1500,0 ng/mL; 1750,0 ng/mL; 2000,0 ng/mL.

### **Preparasi Larutan Seri Simulasi Sampel**

Sebanyak 2,50 mL larutan simulasi sampel 2,0  $\mu\text{g/mL}$  dilarutkan dengan fase gerak dalam labu takar 25 mL, sehingga diperoleh larutan simulasi sampel dengan konsentrasi 200,0 ng/mL. Sebanyak 500,0  $\mu\text{L}$  larutan simulasi sampel 200,0 ng/mL dimasukkan ke dalam *microtube* 1 mL dan diencerkan dengan fase gerak hingga 1 mL, sehingga diperoleh seri simulasi sampel rendah dengan konsentrasi 100,0 ng/mL. Sebanyak 375,0 dan 625,0  $\mu\text{L}$  larutan simulasi sampel 2,0  $\mu\text{g/mL}$  dimasukkan ke dalam *microtube* 1 mL dan diencerkan dengan fase gerak hingga 1 mL, sehingga diperoleh seri simulasi sampel tengah dan tinggi dengan konsentrasi 750,0 dan 1250,0 ng/mL. Masing-masing larutan disaring menggunakan *millipore* dan diawaudarakan selama 5 menit.

### **Pembuatan Larutan Blank**

Sebanyak 70,0 mL propilen glikol dan 30,0 mL gliserol diambil dan dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL, sehingga diperoleh larutan propilen glikol : gliserol dengan perbandingan 70:30. Larutan *blank* diberikan perlakuan yang sama seperti pada pembuatan larutan seri simulasi sampel.

### **Optimasi dan Validasi Metode Analisis**

#### **Selektivitas**

Larutan seri simulasi sampel diinjeksikan ke dalam sistem HPLC fase terbalik dengan menggunakan fase gerak metanol : ammonium asetat 10 mM (70:30), fase diam oktadesilsilan (C-18) dan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Waktu retensi, nilai *tailing factor*, dan nilai resolusi yang dihasilkan pada kromatogram dapat digunakan untuk menentukan parameter selektivitas dan memastikan bahwa metode tersebut telah optimum. Metode dapat dikatakan optimum apabila dapat menghasilkan pemisahan yang baik ditunjukkan dari bentuk *peak* dengan waktu retensi < 10 menit (Smith, 2002), nilai *tailing factor*  $\leq 2$  (Snyder, 2010), dan nilai resolusi  $\geq 1,5$  (Rohman, 2009).



### **Kurva Baku**

Larutan seri baku nikotin dengan konsentrasi 100,0 ng/mL; 250,0 ng/mL ; 500,0 ng/mL; 750,0 ng/mL; 1000,0 ng/mL; 1250,0 ng/mL yang telah dibuat kemudian disaring dengan *milipore* dan diawaudarakan selama 5 menit. Masing-masing larutan diinjeksikan ke dalam sistem HPLC fase terbalik yang telah optimum. Luas area nikotin akan ditunjukkan oleh kromatogram. Kurva baku diperoleh dengan cara memplotkan luas area nikotin dengan kadar baku nikotin.

### **Linearitas**

Larutan seri baku nikotin dengan konsentrasi 25,0 ng/mL; 50,0 ng/mL; 75,0 ng/mL; 100,0 ng/mL; 250,0 ng/mL ; 500,0 ng/mL; 750,0 ng/mL; 1000,0 ng/mL; 1250,0 ng/mL; 1500,0 ng/mL; 1750,0 ng/mL; 2000,0 ng/mL yang telah dibuat kemudian disaring dengan *milipore* dan diawaudarakan selama 5 menit. Masing-masing larutan diinjeksikan ke dalam sistem HPLC fase terbalik yang telah optimum.

### **Presisi dan Recovery**

Sebanyak 5 replikasi dari 3 tingkatan konsentrasi larutan seri simulasi sampel rendah, menengah, dan tinggi yaitu 100,0; 750,0; dan 1250,0 ng/mL dibuat untuk menentukan nilai presisi dan *recovery*. Masing-masing larutan disaring menggunakan *milipore* dan diawaudarakan selama 5 menit. Larutan tersebut kemudian diinjeksikan ke dalam sistem HPLC yang telah optimum. Nilai AUC dan kadar yang didapat dapat digunakan untuk menentukan parameter presisi dan *recovery*. Nilai koefisien variasi (CV) dibandingkan dengan syarat pada literatur yaitu nilai CV tidak melebihi 15%, apabila CV memenuhi syarat maka metode dapat dikatakan presisi (AOAC, 2013). Nilai *recovery* yang baik yaitu pada rentang 80%-110% (AOAC, 2013).

### **Preparasi Sampel Cairan Rokok Elektrik**

Sebanyak 1,0 mL larutan sampel cairan rokok elektrik merek "X" dilarutkan dengan fase gerak dalam labu takar 10 mL, sehingga diperoleh larutan sampel. Larutan sampel tersebut kemudian diambil sebanyak 250,0  $\mu$ L lalu dilarutkan dengan fase gerak dalam labu takar 25 mL. Sebanyak 250,0  $\mu$ L larutan sampel selanjutnya diencerkan kembali dengan cara dilarutkan dengan 750,0  $\mu$ L

fase gerak dalam *microtube* 1 mL. Pengambilan larutan sampel dilakukan sebanyak 5 kali. Masing-masing larutan kemudian disaring menggunakan *millipore* dan diawadarakan selama 5 menit.

#### **Aplikasi Metode pada Sampel**

Sebanyak 100,0  $\mu\text{L}$  dari 5 pengambilan larutan sampel diinjeksikan pada sistem HPLC fase terbalik dengan fase diam  $\text{C}_{18}$ , fase gerak berupa campuran metanol dan ammonium asetat 10mM (70:30), detektor UV pada panjang gelombang yang telah diperoleh yaitu 261 nm. Kromatogram akan menunjukkan AUC nikotin untuk masing-masing larutan sampel. AUC nikotin kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier dengan fungsi sumbu x sebagai konsentrasi nikotin dan fungsi sumbu y sebagai AUC nikotin. Persamaan regresi linier akan menghasilkan konsentrasi nikotin dalam sampel, kemudian konsentrasi tersebut dikalikan dengan faktor pengenceran (FP) sehingga didapatkan kadar nikotin dalam sampel. Kadar dalam sampel dinyatakan dalam  $(\bar{x} \pm \text{SD})$ .

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

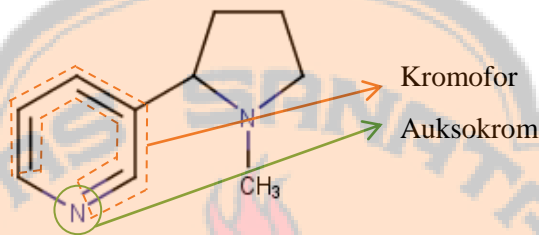
Penelitian ini dilakukan pada sistem HPLC fase terbalik menggunakan komposisi fase gerak campuran metanol : ammonium asetat 10mM (70:30), fase diam oktadesil silika  $\text{C}_{18}$ , kecepatan alir 1,0 mL/menit dan detektor UV 261 nm. Penelitian sebelumnya milik Sumitro (2013) diadaptasi dengan penggantian fase diam menjadi  $\text{C}_{18}$  menghasilkan beberapa parameter validasi yang telah memenuhi syarat meliputi spesifisitas, linearitas, dan rentang pada sampel baku nikotin dalam air. Pada penelitian ini dilakukan validasi metode untuk mendapatkan parameter validasi yang memenuhi syarat yaitu selektivitas, presisi, linearitas, rentang dan *recovery* pada sampel campuran propilen glikol dan gliserol dengan perbandingan 30:70 sehingga metode sepenuhnya valid.

#### **Pengamatan Panjang Gelombang Maksimum**

Pengamatan ini memiliki tujuan untuk mengamati panjang gelombang dengan serapan maksimum dari nikotin. Panjang gelombang maksimum dapat dibaca menggunakan alat spektrofotometer UV-vis. Pengamatan nilai serapan maksimum diharapkan dapat memaksimalkan pembacaan kadar nikotin pada

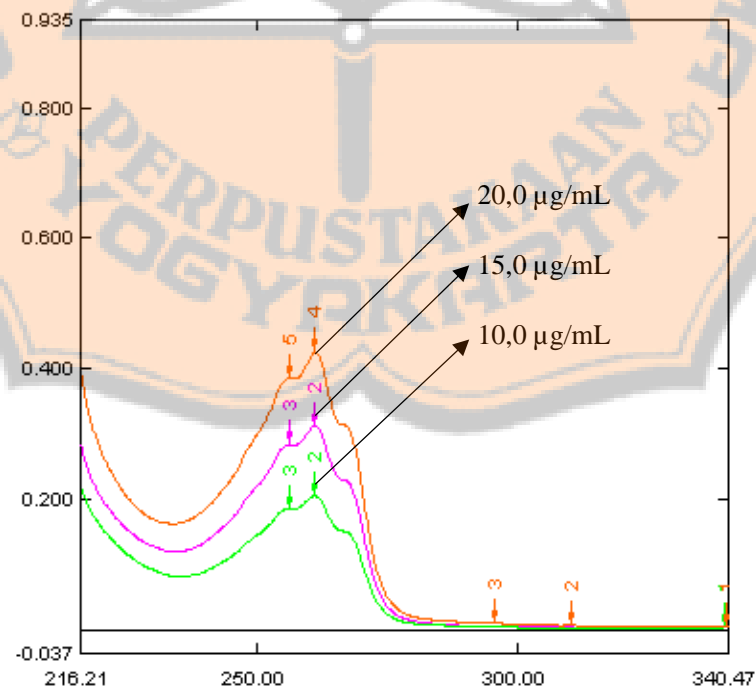
sistem HPLC. Detektor UV-vis dapat membaca senyawa yang menyerap sinar tampak maupun ultraviolet (Meyer, 2004).

Nikotin dapat menyerap lampu ultraviolet karena memiliki gugus kromofor dan auksokrom di mana kedua gugus ini bertanggung jawab pada penyerapan radiasi ultraviolet. Gugus kromofor dan auksokrom dari senyawa nikotin dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. Gugus kromofor dan auksokrom nikotin**

Penentuan panjang gelombang maksimum nikotin dilakukan menggunakan larutan nikotin dengan konsentrasi 10,0; 15,0; dan 20,0  $\mu\text{g/mL}$  yang diukur pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Penggunaan 3 tingkat konsentrasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa bentuk spektrum dan panjang gelombang maksimal yang didapat pada 3 konsentrasi yang berbeda memiliki hasil yang seragam.



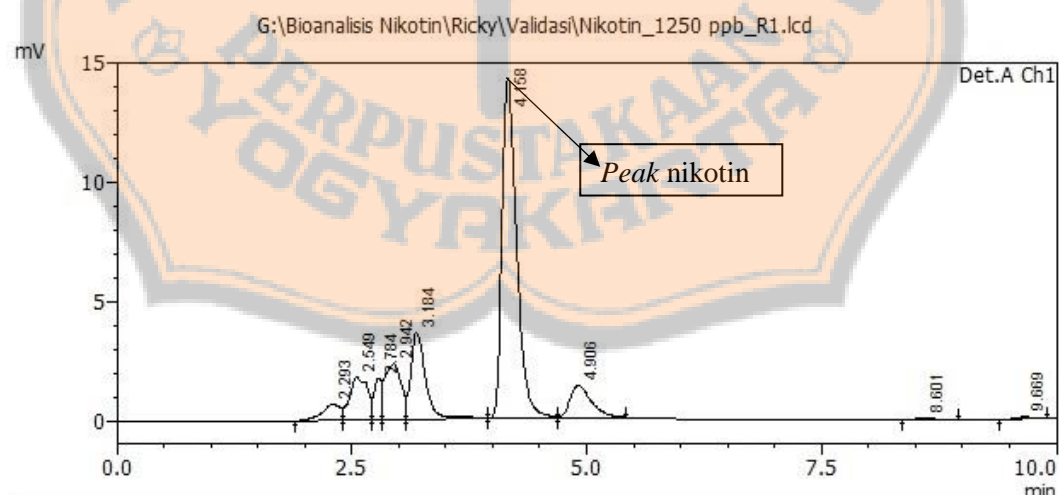
**Gambar 2. Spektrum serapan maksimum nikotin**

Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa serapan maksimum nikotin dalam pelarut metanol : ammonium asetat 10mM (70:30) yaitu pada panjang gelombang 261 nm. Secara teoritis, serapan maksimum nikotin yaitu pada panjang gelombang 260 nm (O'Neil, 2001).

Panjang gelombang nikotin mengalami pergeseran sebesar 1 nm, sehingga panjang gelombang maksimum yang didapatkan pada penelitian ini dapat diterima karena pengujian panjang gelombang dapat digunakan apabila serapan maksimum tepat atau dalam batas 3 nm dari panjang gelombang teoritis (Snyder, 2010).

### Parameter Optimasi Metode

Parameter optimasi yang diamati yaitu selektivitas yang dapat diukur dari waktu retensi, nilai *tailing factor*, dan nilai resolusi. Metode milik Sumitro (2013) diadaptasi dengan penggantian fase gerak metanol : ammonium asetat (70:30), kecepatan alir 1,0 mL/menit pada kondisi isokratik, panjang gelombang 261 nm dalam jangka waktu 10 menit, dan volume injeksi sejumlah 100  $\mu$ L. Peneliti melakukan perubahan komposisi larutan analit yaitu propilen glikol:gliserol (30:70) yang mengandung nikotin, sehingga dilakukan pembuatan sampel simulasi. Pembuatan sampel simulasi digunakan untuk mendapatkan gambaran data apabila nantinya metode akan digunakan pada sampel yang sebenarnya.



**Gambar 3. Kromatogram sampel simulasi nikotin konsentrasi 1250,0 ng/mL**

Waktu retensi yang diharapkan yaitu kurang dari 10 menit, karena senyawa nikotin dengan bobot molekul kecil (< 500) seharusnya dapat mudah

keluar dari kolom (Meyer, 2004). Bentuk puncak yang baik memiliki nilai *tailing factor* kurang dari 2, hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang dianalisis dapat keluar secara bersamaan dari kolom (Snyder *et al.*, 2010). Resolusi merupakan derajat pemisahan dua komponen campuran dalam proses kromatografi (Hendayana, 2006). Nilai R haruslah mendekati atau lebih dari 1,5 karena akan memberikan pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*) (Rohman, 2009).

Kromatogram larutan simulasi yang diinjeksikan dalam sistem HPLC pada Gambar 3 menunjukkan waktu retensi nikotin < 10 menit; nilai *tailing factor*  $\leq 2$  dan nilai resolusi nikotin  $\geq 1,5$ .

**Tabel I. Nilai waktu retensi pada 3 tingkat konsentrasi nikotin**

| Waktu Retensi | Konsentrasi (ng/mL) |       |        |
|---------------|---------------------|-------|--------|
|               | 100,0               | 750,0 | 1250,0 |
| Replikasi 1   | 4,162               | 4,161 | 4,158  |
| Replikasi 2   | 4,162               | 4,157 | 4,159  |
| Replikasi 3   | 4,186               | 4,158 | 4,243  |
| Replikasi 4   | 4,181               | 4,166 | 4,174  |
| Replikasi 5   | 4,181               | 4,165 | 4,165  |
| Rata-rata     | 4,174               | 4,161 | 4,179  |

Berdasarkan data penelitian yang telah disajikan dalam Tabel I, diperoleh nilai rata-rata waktu retensi nikotin dengan konsentrasi 100,0 ng/mL yaitu pada menit ke 4,1744; nikotin dengan konsentrasi 750,0 ng/mL yaitu pada menit ke 4,1614; dan nikotin dengan konsentrasi 1250,0 ng/mL yaitu pada menit ke 4,179. Ketiga konsentrasi sampel simulasi nikotin menghasilkan rata-rata waktu retensi pada menit ke 4,1718 dan dapat dikatakan baik karena waktu retensi kurang dari 10 menit (Smith, 2002). Data tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki waktu retensi yang optimum untuk analisis nikotin.

Berdasarkan data penelitian yang telah disajikan dalam Tabel II, diperoleh nilai rata-rata *tailing factor* pada konsentrasi 100,0 ng/mL sebesar 1,174; pada konsentrasi 750,0 ng/mL sebesar 1,4998; dan pada konsentrasi 1250,0 sebesar

1,531. Ketiga konsentrasi sampel simulasi nikotin menghasilkan rata-rata nilai *tailing factor* sebesar 1,4016 dan dapat dikatakan baik karena nilai *tailing factor*  $\leq 2$  (Snyder *et al.*, 2010). Data tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki nilai *tailing factor* yang optimum untuk analisis nikotin.

**Tabel II. Nilai *tailing factor* pada 3 tingkat konsentrasi nikotin**

| <i>Tailing Factor</i> | Konsentrasi (ng/mL) |       |        |
|-----------------------|---------------------|-------|--------|
|                       | 100,0               | 750,0 | 1250,0 |
| Replikasi 1           | 0,000               | 1,507 | 1,522  |
| Replikasi 2           | 1,478               | 1,497 | 1,545  |
| Replikasi 3           | 1,485               | 1,492 | 1,527  |
| Replikasi 4           | 1,459               | 1,500 | 1,518  |
| Replikasi 5           | 1,448               | 1,503 | 1,543  |
| Rata-rata             | 1,174               | 1,499 | 1,531  |

**Tabel III. Nilai resolusi pada 3 tingkat konsentrasi nikotin**

| Resolusi    | Konsentrasi (ng/mL) |       |        |
|-------------|---------------------|-------|--------|
|             | 100,0               | 750,0 | 1250,0 |
| Replikasi 1 | 2,069               | 2,193 | 3,430  |
| Replikasi 2 | 1,946               | 1,942 | 3,418  |
| Replikasi 3 | 2,146               | 1,041 | 3,543  |
| Rata-rata   | 2,053               | 1,725 | 3,463  |

Berdasarkan data penelitian yang telah disajikan dalam Tabel III, diperoleh nilai rata-rata resolusi pada konsentrasi 100,0 ng/mL sebesar 2,053; pada konsentrasi 750,0 ng/mL sebesar 1,725; dan pada konsentrasi 1250,0 ng/mL sebesar 3,463. Ketiga konsentrasi sampel simulasi nikotin menghasilkan nilai rata-rata resolusi sebesar 2,413 dan dapat dikatakan baik karena nilai resolusi  $\geq 1,5$  (Rohman, 2009). Data resolusi tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki selektivitas yang optimum untuk analisis nikotin.



### Validasi Metode

Validasi metode dilakukan untuk memastikan metode HPLC yang digunakan memiliki validitas yang baik sehingga hasil yang diperoleh dapat dipercaya dan dipertanggungjawabkan. Pada penelitian ini dilakukan validasi metode pada sampel dengan komposisi campuran propilen glikol dan gliserol dengan perbandingan 30:70 sehingga metode sepenuhnya valid untuk mendapatkan parameter validasi yang memenuhi syarat yaitu selektivitas, presisi, linearitas, rentang dan *recovery*.

### Penentuan Kurva Baku

Kurva baku menggambarkan korelasi antara konsentrasi terhadap respon instrumen berupa AUC (*Area Under the Curve*) yang diperoleh. Seri konsentrasi dari baku harus mampu menjangkau kadar sampel yang akan dianalisis. Seri konsentrasi baku nikotin 100,0 ng/mL; 250,0 ng/mL; 500,0 ng/mL; 750,0 ng/mL; 1000,0 ng/mL; dan 1250,0 ng/mL digunakan dalam pembuatan kurva baku penelitian ini.

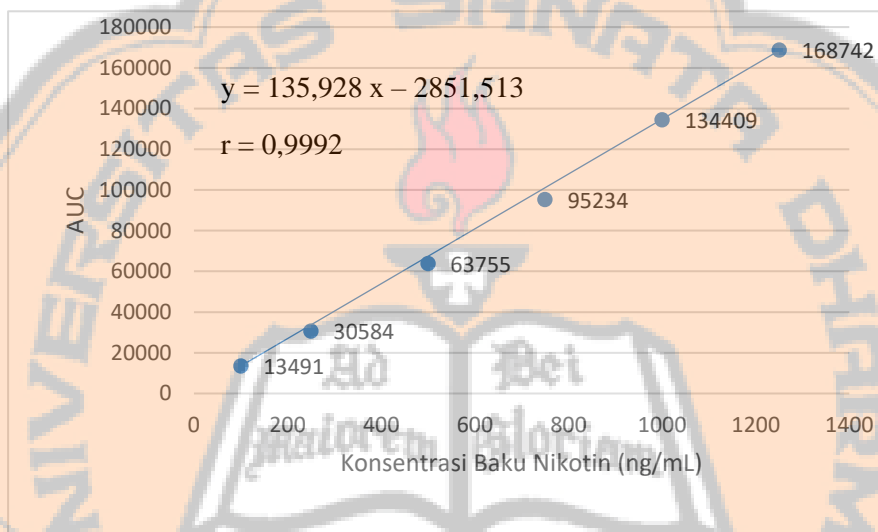
Tabel IV. Perolehan AUC dari 3 replikasi 6 seri baku

| Konsentrasi<br>(ng/mL) | AUC         |             |             |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                        | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 |
| 100,0                  | 13491       | 13355       | 14556       |
| 250,0                  | 30584       | 21795       | 29836       |
| 500,0                  | 63755       | 61846       | 71050       |
| 750,0                  | 95234       | 79864       | 97444       |
| 1000,0                 | 134409      | 135561      | 138248      |
| 1250,0                 | 168742      | 174588      | 168958      |
| Regresi                | 0,9992      | 0,9891      | 0,9986      |

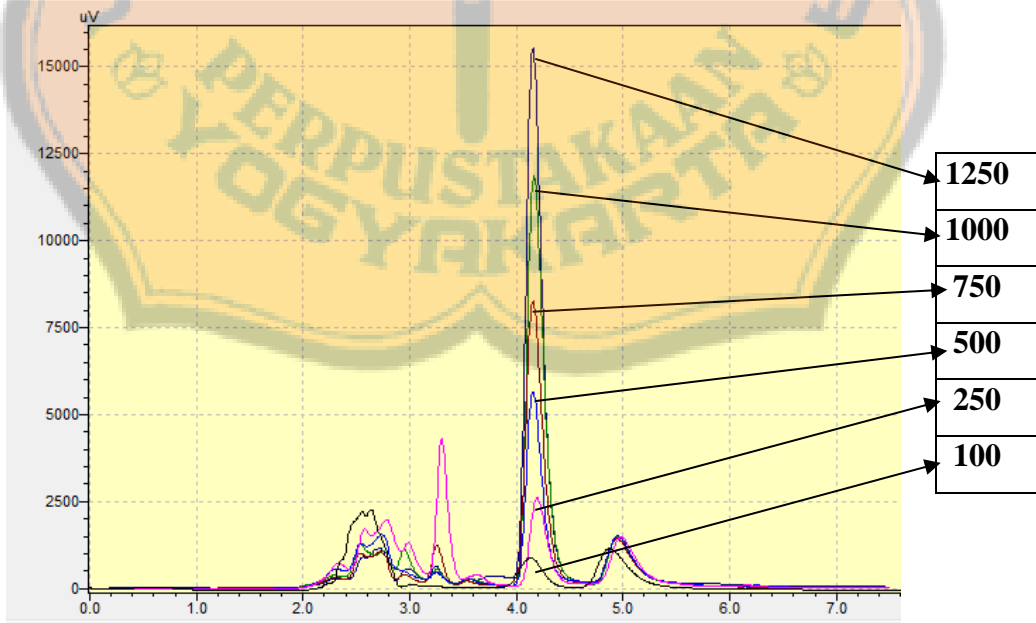
Dari ketiga replikasi seri baku pada Tabel IV, kurva baku yang digunakan adalah kurva baku yang memiliki nilai koefisien korelasi terbaik, yaitu kurva baku pada replikasi pertama yang memiliki nilai koefisien korelasi 0,9992. Kurva baku dapat dinyatakan linear apabila memiliki nilai koefisien korelasi  $\geq 0,998$

(Kazakevich dan Lobrutto, 2007). Hasil dari kurva baku pada replikasi pertama dapat dikatakan linear.

Persamaan kurva baku diperoleh dari plot konsentrasi terhadap AUC nikotin. Hubungan konsentrasi dengan AUC nikotin dapat dilihat pada Gambar 4. Semakin tinggi konsentrasi nikotin, maka respon instrumen berupa AUC nikotin akan semakin tinggi juga seperti dapat dilihat pada Gambar 5. Kurva baku akan menghasilkan persamaan  $y=bx+a$ ; di mana  $a$  adalah *intercept*;  $b$  adalah *slope*;  $y$  adalah AUC; dan  $x$  adalah kadar nikotin.



Gambar 4. Kurva baku nikotin



Gambar 5. Stacking kromatogram kurva baku nikotin (ppb)

### Linearitas

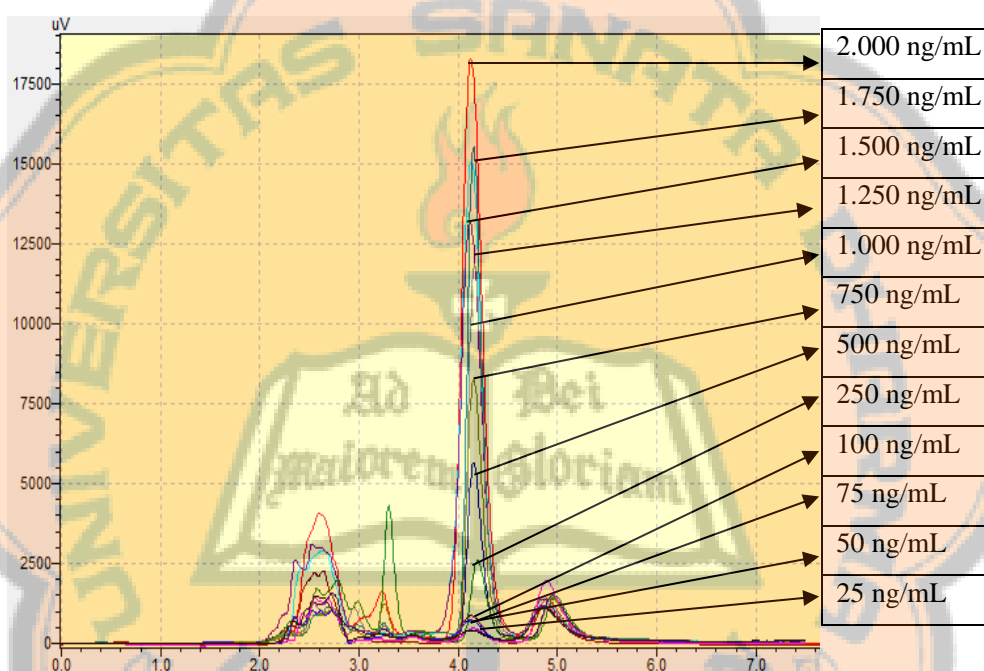
Penambahan tiga seri konsentrasi di atas dan di bawah seri konsentrasi baku dilakukan untuk membuat rentang kurva baku. Rentang kurva baku bertujuan untuk memastikan respon instrumen terhadap analit yang berada di luar kurva baku akan tetap berada di dalam rentang sehingga tidak mengalami ekstrapolasi. Seri konsentrasi baku nikotin 25,0 ng/mL; 50,0 ng/mL; 75,0 ng/mL; 100,0 ng/mL; 250,0 ng/mL ; 500,0 ng/mL; 750,0 ng/mL; 1000,0 ng/mL; 1250,0 ng/mL; 1500,0 ng/mL; 1750,0 ng/mL; 2000,0 ng/mL digunakan sebagai *range*. Tabel VI menunjukkan data rentang pada replikasi pertama memiliki nilai koefisien korelasi terbaik.

**Tabel V. Data range**

| Konsentrasi<br>(ng/mL)       | AUC         |             |             |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                              | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 |
| 25                           | 6,128       | 5,946       | 7,758       |
| 50                           | 10,295      | 10,118      | 8,260       |
| 75                           | 12,251      | 12,770      | 13,084      |
| 100                          | 13,491      | 13,355      | 14,556      |
| 250                          | 30,584      | 21,795      | 29,836      |
| 500                          | 63,755      | 61,846      | 71,050      |
| 750                          | 95,234      | 79,864      | 97,444      |
| 1,000                        | 134,409     | 135,561     | 138,248     |
| 1,250                        | 168,742     | 174,588     | 168,958     |
| 1,500                        | 198,606     | 203,638     | 211,207     |
| 1,750                        | 236,074     | 261,611     | 235,117     |
| 2,000                        | 274,506     | 263,083     | 235,453     |
| Regresi (r)                  | 0,9994      | 0,9941      | 0,9945      |
| Koefisien<br>Determinasi (R) | 0,9988      | 0,9882      | 0,9890      |

Data pada tabel V menunjukkan nilai koefisien korelasi (r) yaitu sebesar 0,9994 dan koefisien determinasi (R) yaitu sebesar 0,9988. Metode ini memiliki

koefisien korelasi  $\geq 0,998$  (0,9994) dan koefisien determinasi yang mendekati nilai 1 yang berarti peningkatan konsentrasi nikotin mempengaruhi peningkatan AUC nikotin sebesar 99,88%. Peningkatan tersebut dapat terlihat jelas secara visual pada Gambar 6, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis nikotin yang digunakan dapat dinyatakan linear serta peningkatan konsentrasi nikotin secara signifikan mempengaruhi peningkatan AUC nikotin.



**Gambar 6. Stacking kromatogram range**

#### **Penentuan %Recovery dan Presisi**

Nilai perolehan kembali berasal dari penambahan baku nikotin ke dalam larutan simulasi propilen glikol : gliserol. Penambahan baku dilakukan sebanyak lima replikasi pada konsentrasi rendah, menengah, dan tinggi yaitu 100,0; 750,0; dan 1250,0 ng/mL. *Recovery* digunakan sebagai pengukuran tingkat efisiensi dan efektivitas dari konsentrasi nikotin setelah mendapatkan perlakuan dalam proses preparasi sampel.

Nilai konsentrasi baku nikotin yang digunakan dalam penentuan *recovery* adalah 100,0; 750,0; dan 1250,0 ng/mL. Berdasarkan Tabel VI, nilai rata-rata *recovery* pada konsentrasi 100,0 ng/mL sebesar 136,3863%; 750,0 ng/mL sebesar

97,2415%; dan pada konsentrasi 1250 ng/mL sebesar 95,11583%. Nilai %*recovery* pada konsentrasi 750,0 ng/mL dan 1250,0 ng/mL yang didapatkan dapat dikatakan baik karena masih masuk dalam rentang 80%-110%, sehingga memenuhi syarat *recovery* yang baik (AOAC, 2013). Konsentrasi 750,0 ng/mL memiliki nilai CV yang lebih kecil, sehingga dapat dikatakan memiliki nilai *recovery* yang lebih seragam. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa metode yang digunakan dapat memberikan hasil perolehan kembali yang optimum.

**Tabel VI. Data *recovery* dan presisi nikotin**

| Level        | Kadar Baku Nikotin (ng/mL) | Kadar Nikotin Terukur (ng/mL) | <i>Recovery</i> (%) | Rata-rata (ng/mL) | <i>SD</i> | CV (%) |
|--------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|-----------|--------|
| <i>Blank</i> | 0                          | 0                             |                     |                   |           |        |
| Rendah       | 100,0                      | 129,388                       | 129,388             | 136,386           | 6,202     | 4,547  |
|              |                            | 131,595                       | 131,595             |                   |           |        |
|              |                            | 136,598                       | 136,598             |                   |           |        |
|              |                            | 144,904                       | 144,904             |                   |           |        |
|              |                            | 139,445                       | 139,445             |                   |           |        |
| Tengah       | 750,0                      | 739,704                       | 98,627              | 729,3119          | 12,314    | 1,688  |
|              |                            | 728,374                       | 97,116              |                   |           |        |
|              |                            | 708,548                       | 94,473              |                   |           |        |
|              |                            | 733,818                       | 97,842              |                   |           |        |
|              |                            | 736,114                       | 98,148              |                   |           |        |
| Tinggi       | 1250,0                     | 1158,161                      | 92,652              | 1188,948          | 29,436    | 2,475  |
|              |                            | 1169,351                      | 93,548              |                   |           |        |
|              |                            | 1196,475                      | 95,718              |                   |           |        |
|              |                            | 1186,301                      | 94,904              |                   |           |        |
|              |                            | 1234,451                      | 98,756              |                   |           |        |

Berdasarkan Tabel VI, Nikotin dengan konsentrasi 750 ng/mL memiliki nilai CV yang terkecil dan nilai < 15% , sehingga dapat dikatakan memiliki nilai

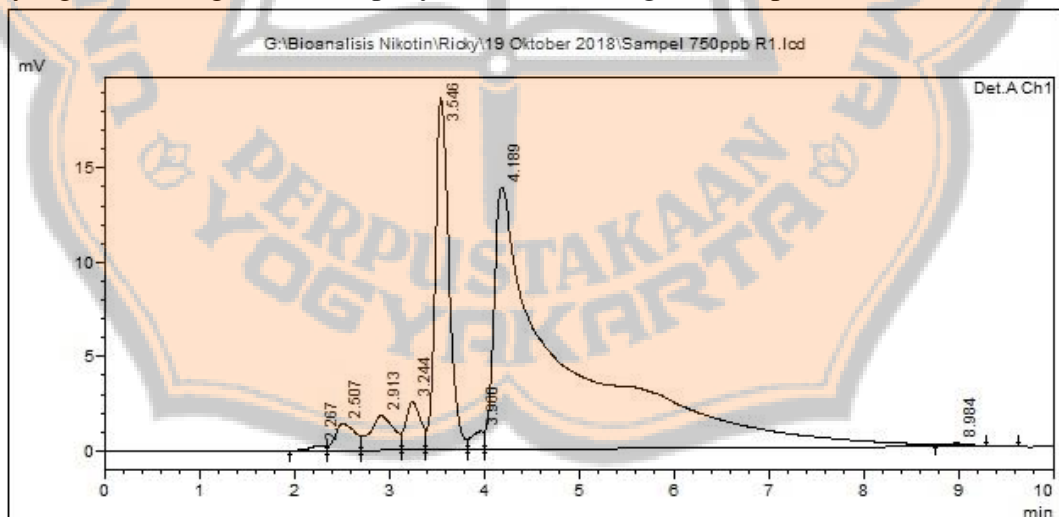
yang paling baik dan seragam apabila dibandingkan dengan konsentrasi lain (AOAC, 2013).

### Aplikasi Metode pada Sampel

Metode yang telah optimum kemudian diaplikasikan pada sampel cairan rokok elektrik. Aplikasi metode bertujuan untuk melihat hasil sebenarnya apabila metode digunakan pada sampel cairan rokok elektrik yang sebenarnya. Metode yang telah divalidasi sebelumnya yaitu sistem HPLC fase terbalik dengan komposisi fase gerak campuran metanol : ammonium asetat 10mM (70:30), fase diam oktadesil silika C18, kecepatan alir 1,0 mL/menit dan detektor UV 261 nm.

### Aplikasi Pada Sampel Cairan Rokok Elektrik

Analisis paling baik dilakukan pada konsentrasi nikotin 750 ng/mL, konsentrasi tersebut juga dipilih untuk mencegah kadar di luar kurva baku. Sampel yang dipilih dalam penelitian ini adalah satu botol cairan rokok elektrik merek “X” rasa melon kemasan 60 mL. Sampel cairan rokok elektrik tersebut memiliki komposisi propilen glikol dan gliserol dengan perbandingan 30:70, serta tambahan nikotin dan perasa melon. Label kemasan sampel menuliskan konsentrasi nikotin yang terkandung dalam sampel yaitu sebesar 3 mg/mL sampel.



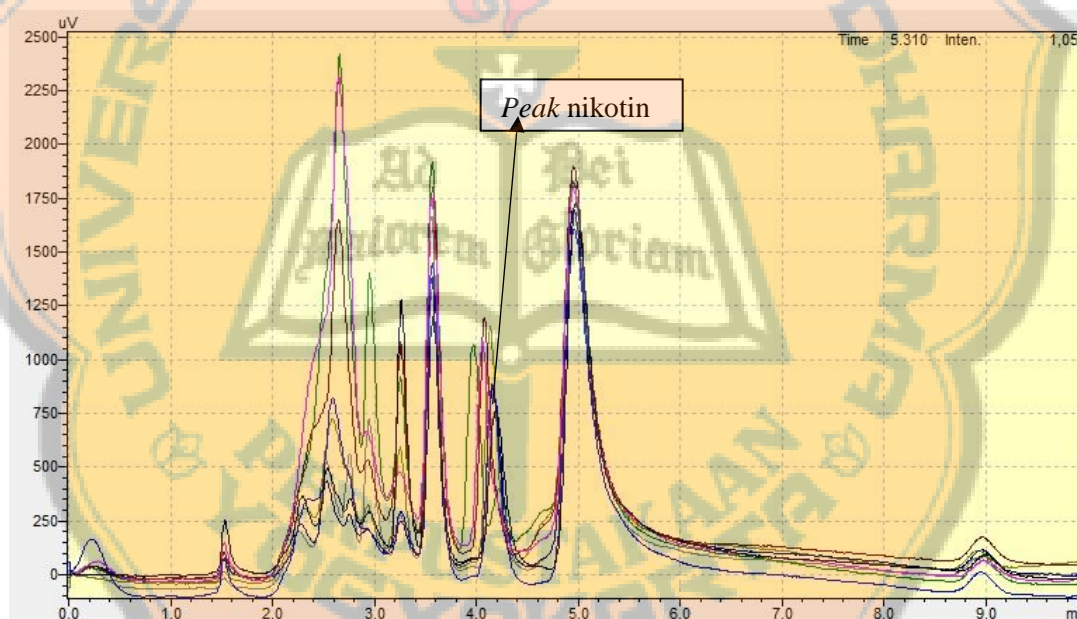
**Gambar 7. Kromatogram sampel konsentrasi 750 ng/mL**

Setelah dilakukan pembacaan pada nikotin dengan konsentrasi 750 ng/mL seperti pada Gambar 7, didapatkan hasil *peak* yang kurang baik. Hal ini disebabkan karena cairan sampel yang terlalu pekat sehingga menimbulkan *tailing* berlebihan,

sehingga konsentrasi sampel diturunkan untuk menghindari terjadinya *tailing* yang berlebihan.

**Tabel VII. Data aplikasi metode pada sampel cairan rokok elektrik**

| Repetisi  | Kadar Nikotin (ng/mL) | Kadar Sampel xFP (ng/mL) | Kadar Sampel xFP (mg/mL) | SD      | CV Kadar Sampel (%) |
|-----------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------|---------------------|
| 1         | 81,333                | 325334,4                 | 0,325                    | 0,03558 | 10,102              |
| 2         | 103,337               | 413348,0                 | 0,413                    |         |                     |
| 3         | 91,287                | 365149,2                 | 0,365                    |         |                     |
| 4         | 93,126                | 372506,4                 | 0,372                    |         |                     |
| 5         | 84,107                | 336428,4                 | 0,336                    |         |                     |
| 6         | 87,270                | 349082,0                 | 0,349                    |         |                     |
| 7         | 76,051                | 304205,2                 | 0,304                    |         |                     |
| Rata-rata | 88,073                | 360308,0                 | 0,360                    |         |                     |



**Gambar 8. Stacking kromatogram sampel**

Kadar nikotin dalam sampel dapat dihitung dengan persamaan regresi linier yaitu  $y=135,928x-2851,513$  dengan fungsi sumbu x sebagai konsentrasi nikotin dan fungsi sumbu y sebagai AUC nikotin. Data penelitian yang telah disajikan Tabel VII menunjukkan kadar nikotin sebesar 88,0735 ng/mL. Sampel mengalami ekstrapolasi karena pembacaan kadar di bawah 100 ng/mL, namun kadar tetap berada dalam *range* bawah yaitu 25 ng/mL sehingga hasil masih dapat dipertanggungjawabkan. Kadar nikotin yang didapatkan kemudian dikalikan



dengan faktor pengenceran (FP) dan didapatkan rata-rata kadar nikotin dalam sampel cairan rokok elektrik merek “X” kemasan 60 mL sebesar 0,3602 mg/mL.

Pada percobaan aplikasi metode ini didapatkan hasil yang baik, ditunjukkan dengan nilai resolusi  $\geq 1,5$ ; waktu retensi  $< 10$  menit, dari bentuk *peak* dengan nilai *tailing factor*  $\leq 2$ , nilai CV kadar  $< 15\%$ .

### **KESIMPULAN**

Hasil penelitian menggunakan sistem HPLC fase terbalik dengan kolom C18, fase gerak berupa campuran metanol : ammonium asetat (70:30), kecepatan alir 1,0 mL/menit memenuhi parameter optimasi dan parameter validasi. Waktu retensi pada konsentrasi 750,0 ng/mL yaitu pada menit ke 4,1614; nilai *tailing factor* sebesar 1,4998; nilai resolusi sebesar 1,725; nilai *recovery* sebesar 97,2415%; dan CV sebesar 1,688%.

### **SARAN**

Dilakukan penetapan kadar lebih lanjut dengan jumlah replikasi sampel cairan rokok elektrik yang lebih banyak agar hasilnya dapat menggambarkan kadar yang sebenarnya pada sampel. Penelitian lebih lanjut mengenai penetapan kadar nikotin pada cairan rokok elektrik dengan perbandingan komposisi utama sampel yang berbeda dan varian rasa yang berbeda perlu dilakukan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- AOAC, 2013. Guideline for dietary supplements and botanicals. Association of Official Analytical Chemists, 3.
- Domino, E.F., 1999. Pharmacological Significance of Nicotine, in Gorrod, J.W., and Jacob, P. *Analytical Determination of Nicotine and Their Compound and Their Metabolites*, Chapter 1, Elsevier, Italy, pp.2-4, 7, 75-76, 362, 499.
- Harmita, 2009. *Analisis Fisikokimia*. Volume 2. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 13, 21, 25, 38. 102-104, 110, 112.
- Hendayana, S., 2010. *Kimia Pemisahan: Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Cetakan Kedua. PT Remaja Rosdakarya. Bandung. 11, 68-69, 93, 96.
- Kemendagri, 2017. *Peraturan Menteri Perdagangan Republik Indonesia nomor 86 tahun 2017 tentang Ketentuan Impor Rokok Elektrik*. Jakarta. Menteri Perdagangan Republik Indonesia.
- O'Neil, Maryadele J. 2001. *The Merck Index 13th edition*. New York. Merck & Co.Inc.
- Meyer, V., 2004. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 17-57.
- Popl, M., Fahrnich, J., Tatar, V., 1990. *Chromatographic Analysis of Alkaloids*, 53th Edition, Marcel Dekker, Inc, New York, 3
- Presiden Republik Indonesia, 2012. *Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109 Tahun 2012 Tentang Pengamanan Bahan yang Mengandung Zat Adiktif Berupa Produk Tembakau Bagi Kesehatan*. Jakarta. Presiden Republik Indonesia.
- Rohman, A., 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*, Yogyakarta: Penerbit Graha Ilmu, 16-17, 112-116.
- Smith, J.H., 2002. *Chromatographic Properties of Silica-Based Monolithic HPLC Columns*, Dissertation, 5
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Dolan, J.W., 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Introduction to Modern Liquid Chromatography.
- Sumitro, I., 2013. *Validasi Metode dan Penetapan Kadar Ekstrak Tembakau dalam Rokok "Merek X" dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Fase Terbalik Menggunakan Standar Internal Kafein*.
- Talih, 2014. *Effects of user Puff Topography, Device Voltage, and Liquid Nicotine Concentration on Electronic Cigarette Nicotine Yield: Measurements and Model Predictions*.

**Lampiran 1. Kromatogram rentang dan kurva baku nikotin**

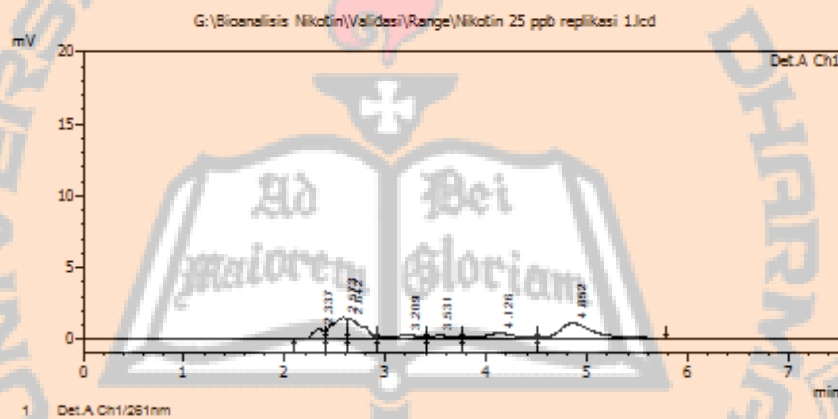
1. Konsentrasi 25 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:58:04 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 25 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : N\_25 PPB\_R1  
 Sample ID : N\_25 PPB\_R1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 11  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 25 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Date Acquired : 9/12/2018 1:05:20 PM  
 Date Processed : 9/24/2018 4:52:53 PM

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/261nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area  | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|-------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.337     | 5385  | 680    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.573     | 15067 | 1475   | 0.382      | 0.000          |
| 3     | 2.642     | 14754 | 1410   | 0.049      | 0.000          |
| 4     | 3.209     | 5330  | 249    | 0.430      | 0.000          |
| 5     | 3.531     | 3304  | 233    | 0.607      | 0.000          |
| 6     | 4.126     | 7758  | 363    | 1.232      | 0.000          |
| 7     | 4.852     | 24724 | 1062   | 1.338      | 0.000          |
| Total |           | 76322 | 5472   |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 25 ppb replikasi 1.lcd

2. Konsentrasi 50 ppb replikasi 1

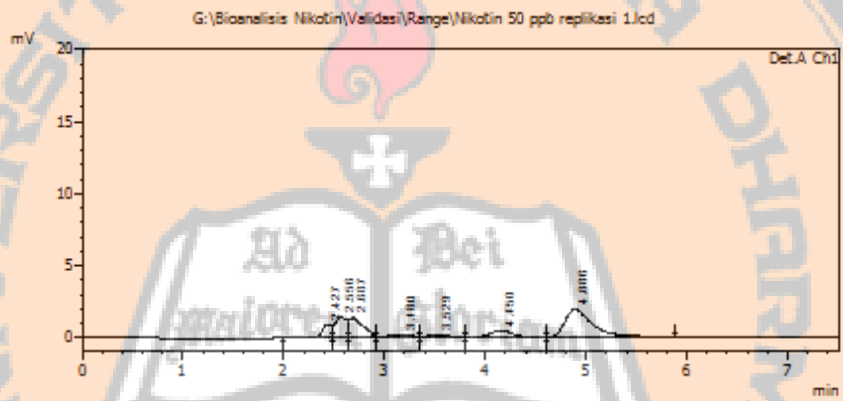
9/25/2018 16:57:02 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 50 ppb replikasi 1.lcd

Acquired by : Admin  
 Sample Name : N\_50 PFB\_R1  
 Sample ID : N\_50 PFB\_R1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 14  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 50 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/12/2018 1:43:32 PM  
 Data Processed : 9/12/2018 4:00:48 PM

<Chromatogram>



Detector A Ch1 261nm

| Peak# | Ret. Time | Area  | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|-------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.427     | 6388  | 930    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.556     | 12923 | 1436   | 0.211      | 0.000          |
| 3     | 2.687     | 12562 | 1385   | 0.222      | 0.000          |
| 4     | 3.180     | 2854  | 142    | 0.865      | 0.000          |
| 5     | 3.529     | 3254  | 219    | 0.666      | 0.000          |
| 6     | 4.150     | 8260  | 466    | 1.598      | 0.000          |
| 7     | 4.886     | 37948 | 1947   | 1.657      | 1.935          |
| Total |           | 84189 | 6526   |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 50 ppb replikasi 1.lcd

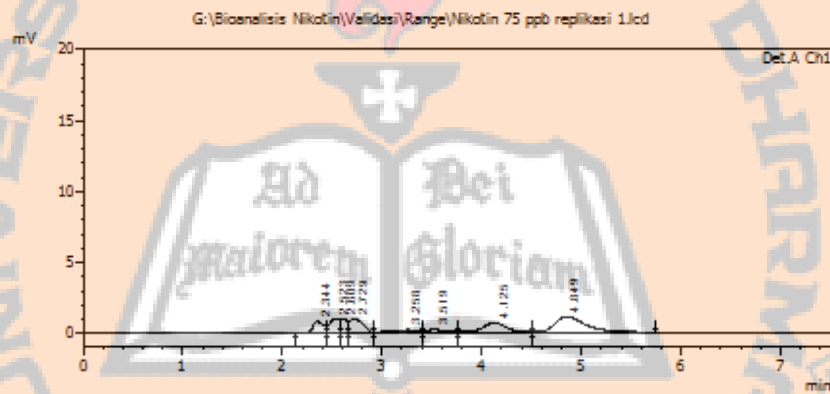
3. Konsentrasi 75 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:57:50 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin  
 Sample Name : N\_75 PPB\_R1  
 Sample ID : N\_75 PPB\_R1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 17  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 75 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.lcr  
 Date Acquired : 9/12/2018 2:27:25 PM  
 Data Processed : 9/12/2018 4:08:28 PM

<Chromatogram>



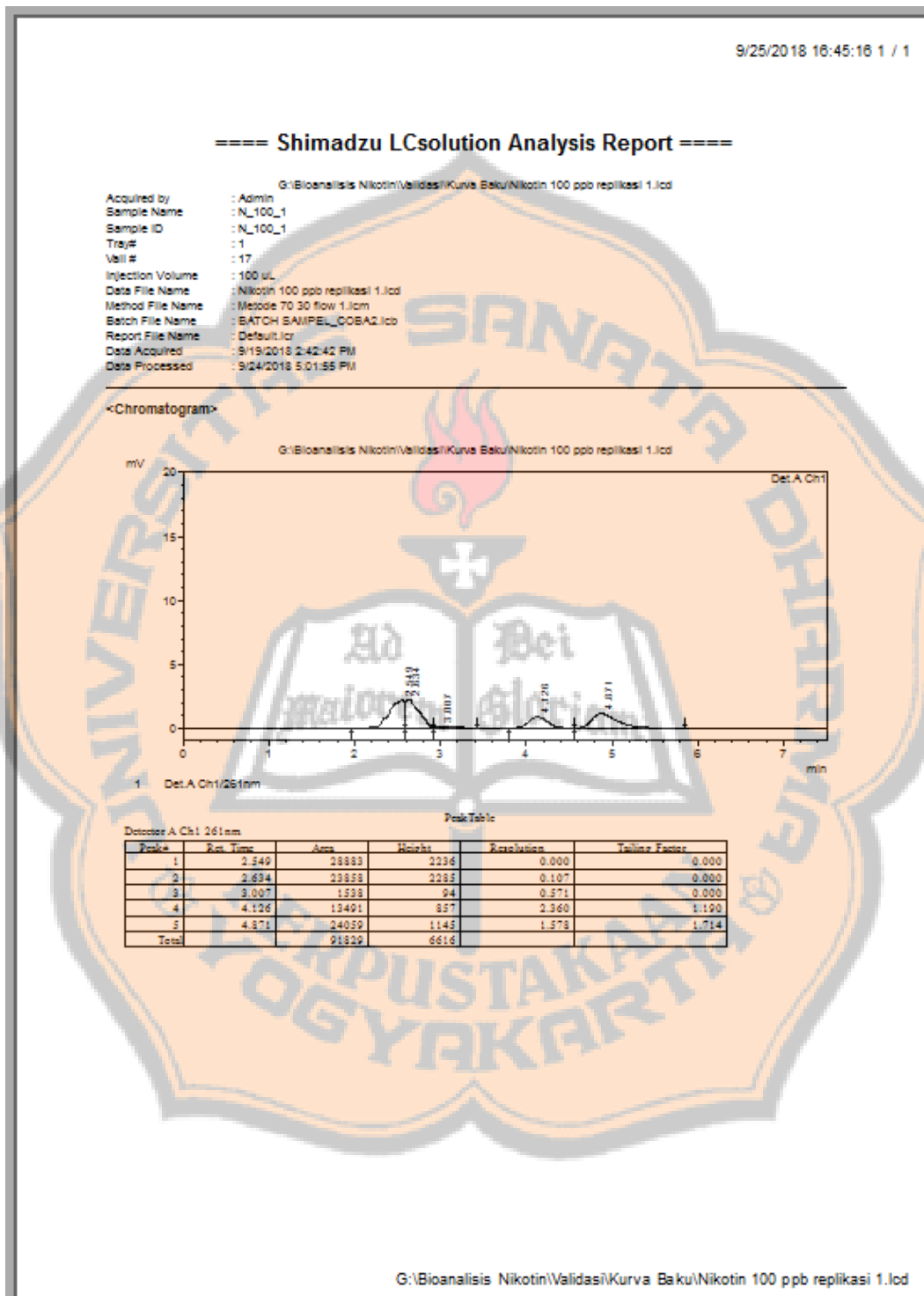
Detector A Ch1 261nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area  | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|-------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.344     | 6514  | 815    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.523     | 6702  | 1045   | 0.409      | 0.000          |
| 3     | 2.609     | 4908  | 1019   | 0.146      | 0.000          |
| 4     | 2.729     | 9735  | 1026   | 0.193      | 0.000          |
| 5     | 3.258     | 4468  | 231    | 0.824      | 0.000          |
| 6     | 3.519     | 3632  | 244    | 0.460      | 0.000          |
| 7     | 4.125     | 13084 | 684    | 1.333      | 0.000          |
| 8     | 4.849     | 25669 | 1153   | 1.452      | 0.000          |
| Total |           | 74612 | 6217   |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 75 ppb replikasi 1.lcd

4. Konsentrasi 100 ppb replikasi 1



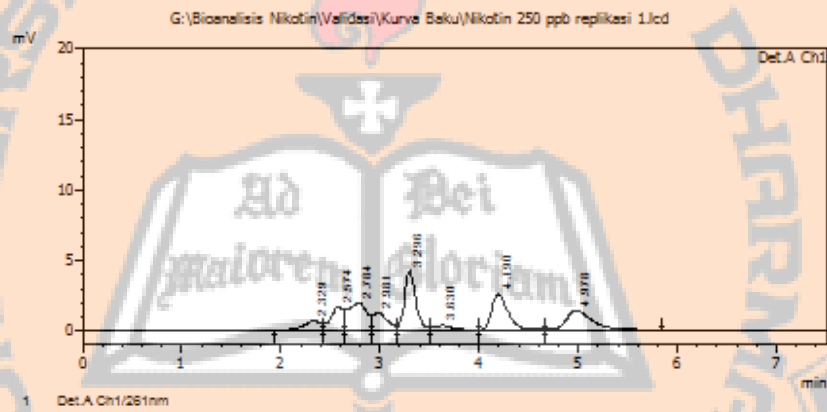
5. Konsentrasi 250 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:46:14 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 250 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin 250 ppb  
 Sample ID : Nikotin 250 ppb  
 Tray# : 1  
 Vial# : 12  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 250 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.rpt  
 Date Acquired : 9/6/2018 12:50:54 PM  
 Date Processed : 9/6/2018 3:04:02 PM

<Chromatogram>



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.329     | 9496   | 708    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.574     | 15244  | 1703   | 0.434      | 0.000          |
| 3     | 2.784     | 26394  | 1967   | 0.329      | 0.000          |
| 4     | 2.981     | 12925  | 1288   | 0.347      | 0.000          |
| 5     | 3.295     | 34006  | 4274   | 0.903      | 0.000          |
| 6     | 3.630     | 5302   | 364    | 0.967      | 0.000          |
| 7     | 4.190     | 30584  | 2564   | 1.431      | 1.530          |
| 8     | 4.978     | 26797  | 1420   | 2.067      | 0.000          |
| Total |           | 160748 | 14288  |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 250 ppb replikasi 1.lcd



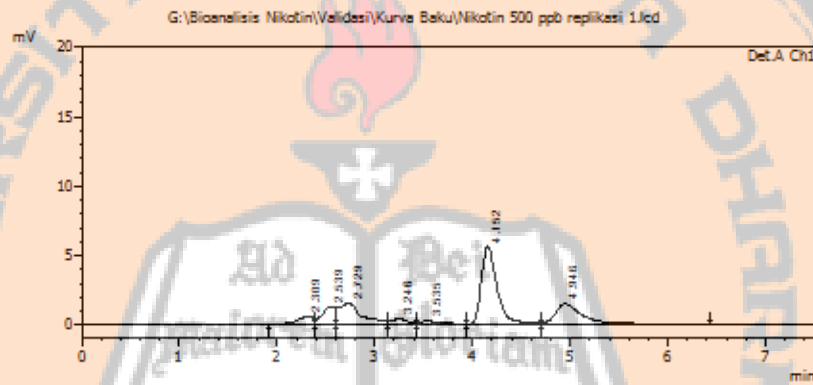
6. Konsentrasi 500 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:46:49 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 500 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin 500 ppb  
 Sample ID : Nikotin 500 ppb  
 Tray# : 1  
 Vial# : 13  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 500 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/19/2018 1:02:16 PM  
 Data Processed : 9/19/2018 3:03:18 PM

<Chromatogram>



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.309     | 7099   | 545    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.539     | 11744  | 1274   | 0.288      | 0.000          |
| 3     | 2.729     | 25356  | 1531   | 0.261      | 0.000          |
| 4     | 3.246     | 4803   | 433    | 1.119      | 0.000          |
| 5     | 3.535     | 3873   | 263    | 0.839      | 0.000          |
| 6     | 4.152     | 63755  | 5616   | 1.934      | 1.534          |
| 7     | 4.946     | 29982  | 1469   | 2.097      | 0.000          |
| Total |           | 146612 | 11131  |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 500 ppb replikasi 1.lcd

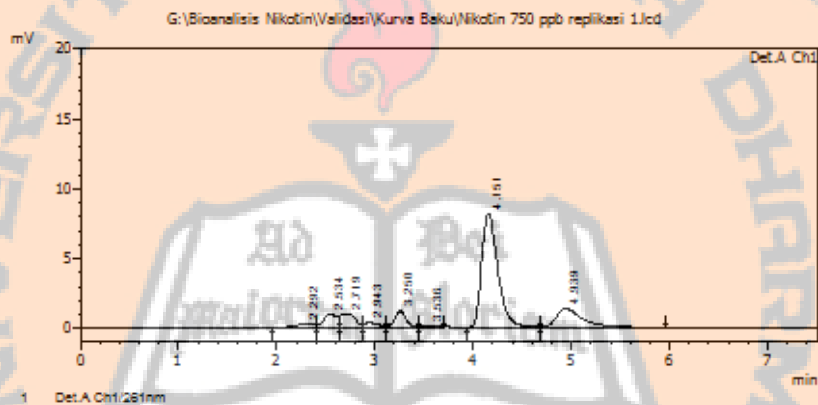
7. Konsentrasi 750 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:48:10 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 750 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin 750 ppb  
 Sample ID : Nikotin 750 ppb  
 Tray# : 1  
 Vial # : 14  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 750 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/6/2018 1:20:05 PM  
 Data Processed : 9/6/2018 3:02:37 PM

<Chromatogram>



Detector A: Ch1 261nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.292     | 3869   | 277    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.534     | 9850   | 975    | 0.192      | 0.000          |
| 3     | 2.719     | 10521  | 1032   | 0.147      | 0.000          |
| 4     | 2.943     | 3885   | 363    | 0.416      | 0.000          |
| 5     | 3.250     | 9905   | 1207   | 1.009      | 0.000          |
| 6     | 3.536     | 1838   | 170    | 1.064      | 0.000          |
| 7     | 4.151     | 95234  | 8209   | 1.985      | 1.465          |
| 8     | 4.939     | 27294  | 1382   | 2.061      | 0.000          |
| Total |           | 162395 | 13516  |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 750 ppb replikasi 1.lcd

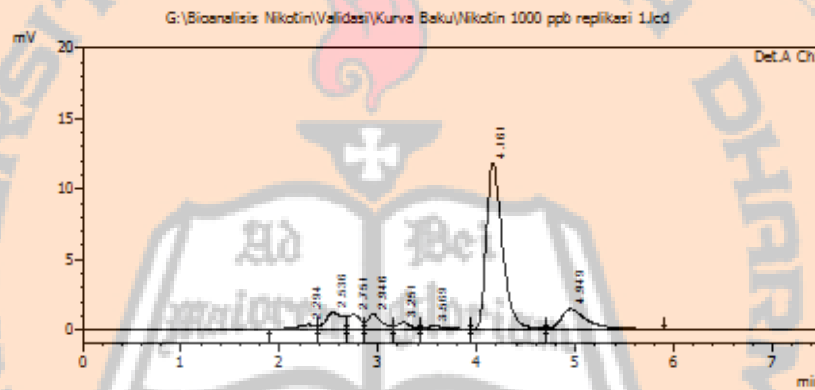
8. Konsentrasi 1000 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:48:48 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 1000 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin 1000 ppb  
 Sample ID : Nikotin 1000 ppb  
 Tray# : 1  
 Vial# : 15  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 1000 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/6/2018 1:52:38 PM  
 Data Processed : 9/6/2018 3:01:57 PM

<Chromatogram>



Detector A Ch1 261nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.294     | 5060   | 348    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.536     | 15055  | 1240   | 0.363      | 0.000          |
| 3     | 2.751     | 9502   | 1053   | 0.364      | 0.000          |
| 4     | 2.946     | 10805  | 1109   | 0.393      | 0.000          |
| 5     | 3.251     | 4761   | 511    | 1.118      | 0.000          |
| 6     | 3.569     | 3652   | 239    | 1.006      | 0.000          |
| 7     | 4.161     | 134409 | 11822  | 1.787      | 1.477          |
| 8     | 4.949     | 26932  | 1433   | 2.090      | 1.763          |
| Total |           | 210175 | 17755  |            |                |

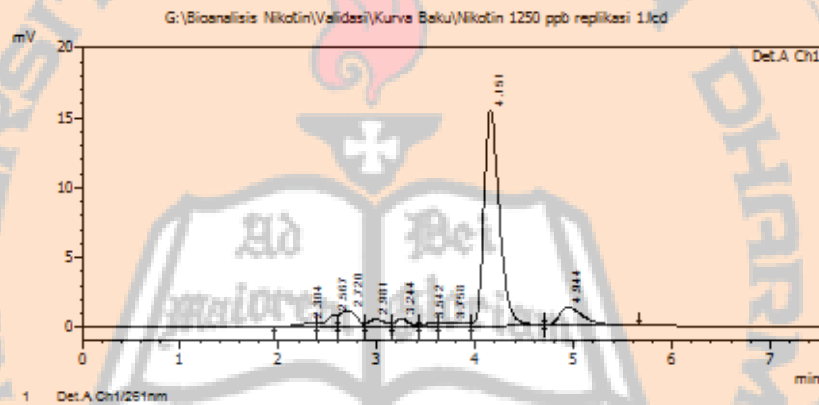
7. Konsentrasi 1250 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:51:46 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 1250 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin 1250 ppb  
 Sample ID : Nikotin 1250 ppb  
 Tray# : 1  
 Vial# : 16  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 1250 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.lcr  
 Date Acquired : 9/6/2018 2:02:45 PM  
 Data Processed : 9/6/2018 3:01:12 PM

<Chromatogram>



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.304     | 3147   | 236    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.567     | 6302   | 855    | 0.232      | 0.000          |
| 3     | 2.720     | 13269  | 1107   | 0.158      | 0.000          |
| 4     | 2.981     | 5863   | 512    | 0.629      | 0.000          |
| 5     | 3.244     | 5015   | 569    | 0.886      | 0.000          |
| 6     | 3.542     | 1901   | 206    | 0.821      | 0.000          |
| 7     | 3.758     | 4738   | 278    | 0.311      | 0.000          |
| 8     | 4.151     | 168742 | 15436  | 0.654      | 1.402          |
| 9     | 4.944     | 22828  | 1321   | 2.194      | 1.647          |
| Total |           | 231806 | 20521  |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Kurva Baku\Nikotin 1250 ppb replikasi 1.lcd

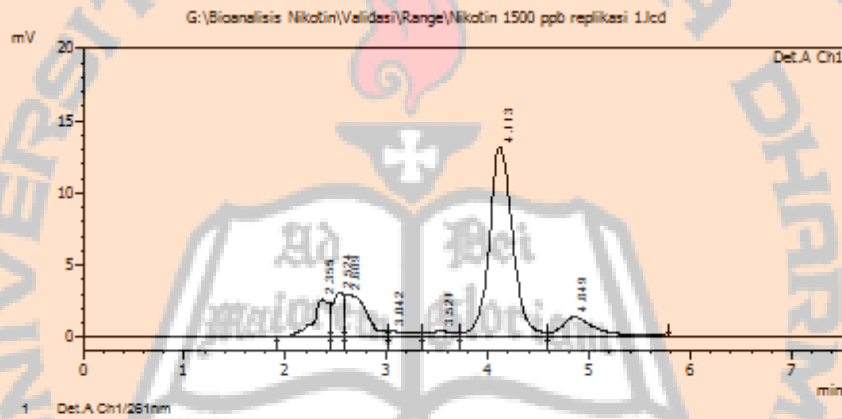
8. Konsentrasi 1500 ppb replikasi 1

9/25/2018 16:58:52 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 1500 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : N\_1500 PPB\_R1  
 Sample ID : N\_1500 PPB\_R1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 20  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 1500 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/12/2018 3:10:52 PM  
 Data Processed : 9/12/2018 4:32:19 PM

<Chromatogram>



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.355     | 30151  | 2596   | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.524     | 22558  | 3095   | 0.169      | 0.000          |
| 3     | 2.609     | 42065  | 2980   | 0.041      | 0.000          |
| 4     | 3.042     | 6193   | 373    | 0.133      | 0.000          |
| 5     | 3.521     | 6994   | 364    | 0.112      | 0.000          |
| 6     | 4.113     | 211207 | 13145  | 0.224      | 1.114          |
| 7     | 4.849     | 29396  | 1314   | 1.548      | 0.000          |
| Total |           | 348564 | 23867  |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 1500 ppb replikasi 1.lcd

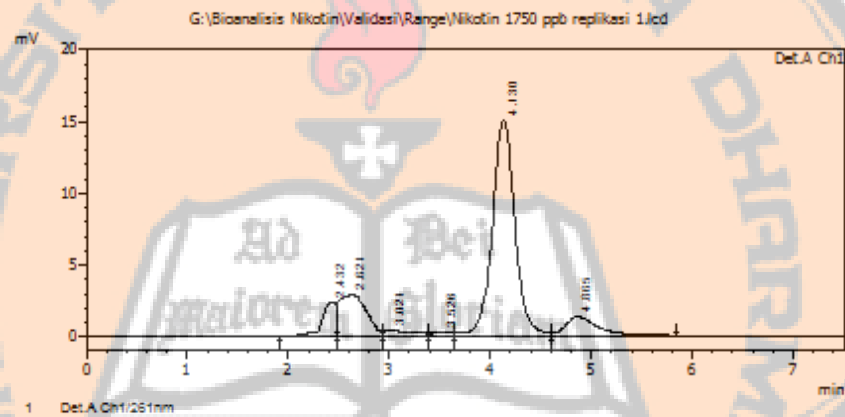
9. Konsentrasi 1750 ppb replikasi 1

9/25/2018 17:00:00 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 1750 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : N\_1750\_R1  
 Sample ID : N\_1750\_R1  
 Tray# : 1  
 Vial# : 23  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 1750 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL\_COBA2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/12/2018 3:48:22 PM  
 Data Processed : 9/12/2018 4:36:50 PM

<Chromatogram>



Detector A Ch1 261nm

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.432     | 23037  | 2361   | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.621     | 54413  | 2887   | 0.185      | 0.000          |
| 3     | 3.021     | 8662   | 387    | 0.322      | 0.000          |
| 4     | 3.526     | 3823   | 307    | 0.400      | 0.000          |
| 5     | 4.130     | 235117 | 15052  | 1.054      | 1.039          |
| 6     | 4.865     | 30091  | 1331   | 1.582      | 0.000          |
| Total |           | 355143 | 22325  |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 1750 ppb replikasi 1.lcd

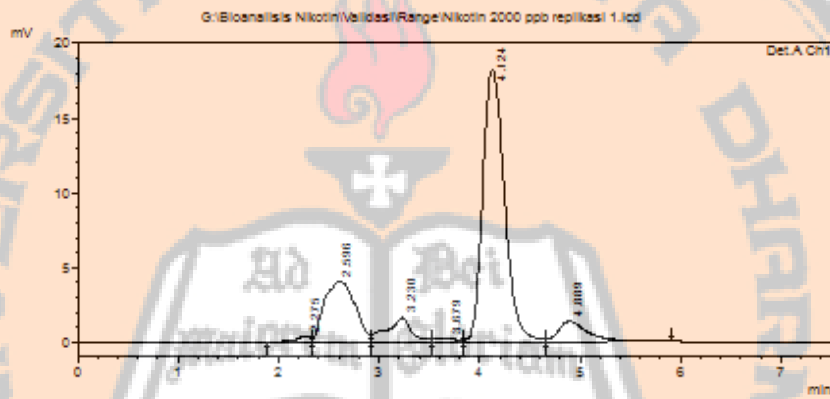
10. Konsentrasi 2000 ppb replikasi 1

9/25/2018 17:01:11 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 2000 ppb replikasi 1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : N\_2000\_1  
 Sample ID : N\_2000\_1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 19  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin 2000 ppb replikasi 1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL\_COBA2.lcd  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/19/2018 3:14:12 PM  
 Data Processed : 9/23/2018 7:27:04 PM

<Chromatogram>



Peak Table

| Peak  | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.275     | 4632   | 399    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 3.596     | 86461  | 4060   | 0.133      | 0.000          |
| 3     | 3.830     | 27925  | 1629   | 1.416      | 0.000          |
| 4     | 3.679     | 3278   | 196    | 0.543      | 0.000          |
| 5     | 4.124     | 274506 | 18245  | 0.529      | 1.284          |
| 6     | 4.880     | 28344  | 1366   | 1.715      | 0.000          |
| Total |           | 405147 | 25395  |            |                |

G:\Bioanalisis Nikotin\Validasi\Range\Nikotin 2000 ppb replikasi 1.lcd



Lampiran 2. Kromatogram selektivitas dan *recovery*

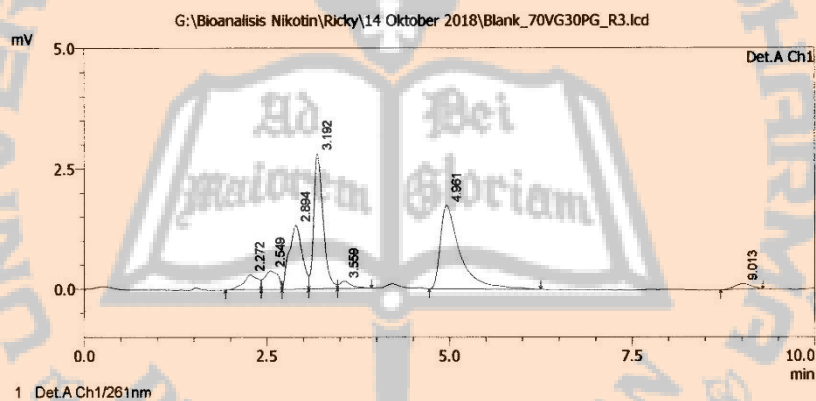
1. *Blank* replikasi 1

1/3/2019 09:55:17 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin  
 Sample Name : Blank\_70VG30PG\_R3  
 Sample ID : Blank\_70VG30PG\_R3  
 Tray# : 1  
 Vial # : 23  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Blank\_70VG30PG\_R3.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL\_COBA2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 10/14/2018 3:54:05 PM  
 Data Processed : 11/15/2018 4:53:54 PM

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/261nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area  | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|-------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.272     | 4356  | 309    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.549     | 4901  | 386    | 0.672      | 0.000          |
| 3     | 2.894     | 16549 | 1330   | 0.955      | 0.000          |
| 4     | 3.192     | 24968 | 2805   | 1.001      | 0.000          |
| 5     | 3.559     | 1755  | 150    | 1.269      | 0.000          |
| 6     | 4.961     | 32767 | 1739   | 3.613      | 2.256          |
| 7     | 9.013     | 1796  | 115    | 9.276      | 1.019          |
| Total |           | 87093 | 6833   |            |                |

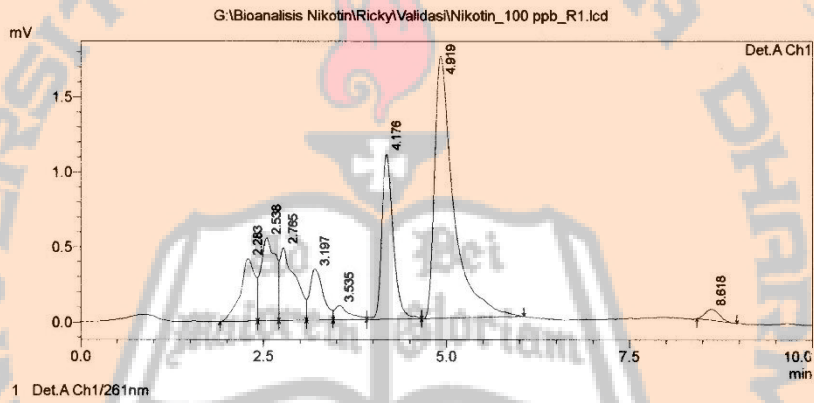
2. Konsentrasi 100 ppb replikasi 1

1/3/2019 09:53:08 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Ricky\Validasi\Nikotin\_100 ppb\_R1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin\_100 ppb\_R1  
 Sample ID : Nikotin\_100 ppb\_R1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 21  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin\_100 ppb\_R1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL\_COBA2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/29/2018 4:57:50 PM  
 Data Processed : 9/29/2018 6:27:52 PM

<Chromatogram>



Detector A Ch1 261nm

| Peak# | Ret. Time | Area  | Height | Tailing Factor | Resolution |
|-------|-----------|-------|--------|----------------|------------|
| 1     | 2.283     | 5881  | 415    | 0.000          | 0.000      |
| 2     | 2.538     | 7770  | 552    | 0.000          | 0.440      |
| 3     | 2.765     | 7079  | 487    | 0.000          | 0.334      |
| 4     | 3.197     | 4314  | 339    | 0.000          | 0.860      |
| 5     | 3.535     | 1307  | 95     | 0.000          | 0.918      |
| 6     | 4.176     | 11813 | 1100   | 1.450          | 1.892      |
| 7     | 4.919     | 31721 | 1743   | 2.474          | 2.128      |
| 8     | 8.618     | 1011  | 73     | 1.248          | 9.395      |
| Total |           | 70897 | 4803   |                |            |

1/3/2019 09:52:06 2 / 2

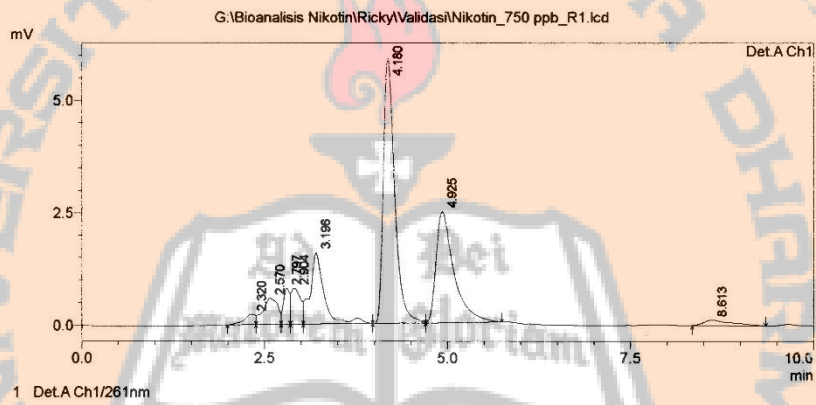
3. Konsentrasi 750 ppb replikasi 1

1/3/2019 09:52:06 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Ricky\Validasi\Nikotin\_750 ppb\_R1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin\_750 ppb\_R1  
 Sample ID : Nikotin\_750 ppb\_R1  
 Tray# : 1  
 Vail # : 23  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Nikotin\_750 ppb\_R1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL\_COBA2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/29/2018 4:12:46 PM  
 Data Processed : 9/29/2018 6:31:51 PM

<Chromatogram>



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.320     | 2418   | 224    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.570     | 8125   | 583    | 0.429      | 0.000          |
| 3     | 2.797     | 4736   | 797    | 0.569      | 0.000          |
| 4     | 2.904     | 7094   | 796    | 0.210      | 0.000          |
| 5     | 3.196     | 20286  | 1588   | 0.655      | 0.000          |
| 6     | 4.180     | 63558  | 5898   | 3.434      | 1.581          |
| 7     | 4.925     | 41965  | 2471   | 2.145      | 2.029          |
| 8     | 8.613     | 3199   | 121    | 5.109      | 1.894          |
| Total |           | 151381 | 12478  |            |                |

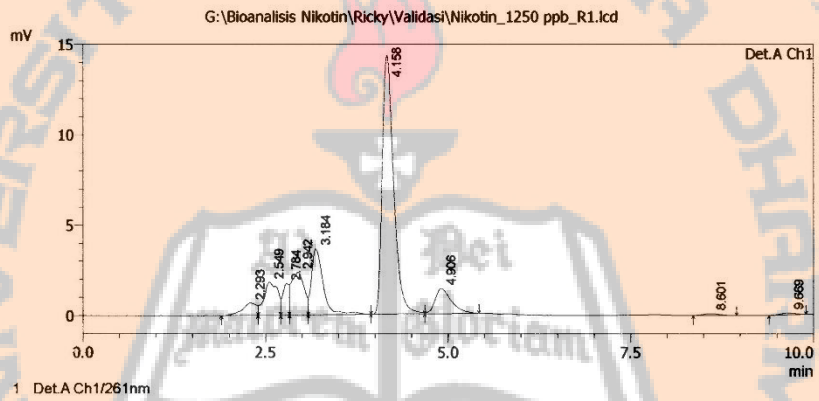
4. Konsentrasi 1250 ppb replikasi 1

1/3/2019 09:53:33 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Ricky\Validasi\Nikotin\_1250 ppb\_R1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Nikotin\_1250 ppb\_R1  
 Sample ID : Nikotin\_1250 ppb\_R1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 25  
 Injection Volume : 100 ul  
 Data File Name : Nikotin\_1250 ppb\_R1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL\_COBA2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 9/29/2018 4:34:13 PM  
 Data Processed : 11/19/2018 9:42:24 AM

<Chromatogram>



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area   | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|--------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.293     | 9206   | 673    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.549     | 23595  | 1819   | 0.542      | 0.000          |
| 3     | 2.784     | 10228  | 1737   | 0.413      | 0.000          |
| 4     | 2.942     | 28410  | 2353   | 0.237      | 0.000          |
| 5     | 3.184     | 39901  | 3646   | 0.579      | 0.000          |
| 6     | 4.158     | 154575 | 14309  | 3.430      | 1.522          |
| 7     | 4.906     | 21593  | 1378   | 2.166      | 1.466          |
| 8     | 8.601     | 1445   | 94     | 8.979      | 1.128          |
| 9     | 9.669     | 1358   | 95     | 2.649      | 0.947          |
| Total |           | 290312 | 26104  |            |                |

**Lampiran 3. Data *recovery* dan presisi**

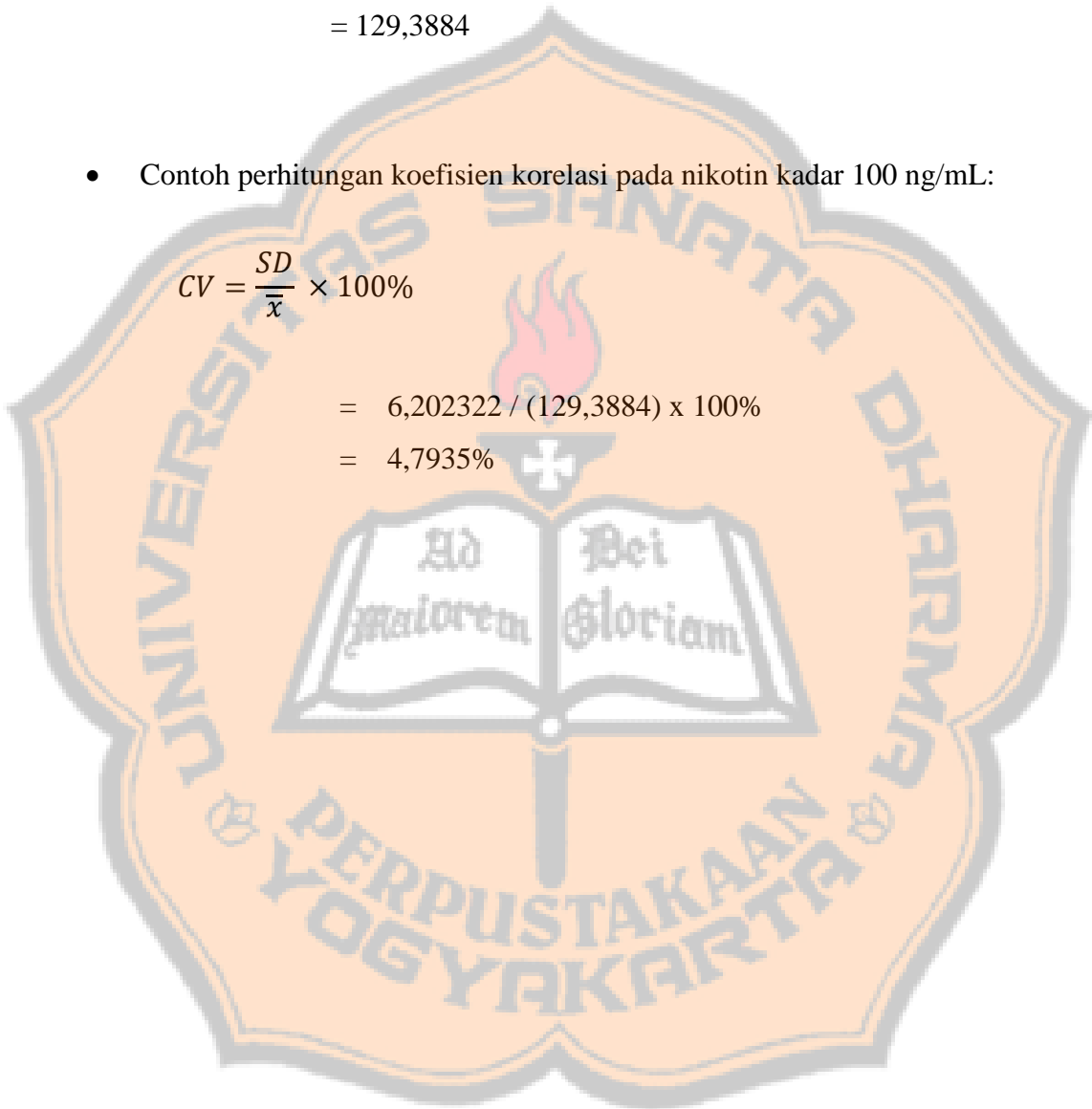
| Konsentrasi<br>(ng/mL) | AUC                        |                               |                     |                   |             |        |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|-------------|--------|
|                        | Replikasi 1                | Replikasi 2                   | Replikasi 3         | Replikasi 4       | Replikasi 5 |        |
| Blank                  | 0                          |                               |                     |                   |             |        |
| 100                    | 14736                      | 15036                         | 15716               | 16845             | 116103      |        |
| 750                    | 97695                      | 96155                         | 93460               | 96895             | 97207       |        |
| 1250                   | 154575                     | 156096                        | 159783              | 158400            | 164945      |        |
| Level                  | Kadar Baku Nikotin (ng/mL) | Kadar Nikotin Terukur (ng/mL) | <i>Recovery</i> (%) | Rata-rata (ng/mL) | <i>SD</i>   | CV (%) |
| <i>Blank</i>           | 0                          | 0                             |                     |                   |             |        |
| Rendah                 | 100,0                      | 129,388                       | 129,388             | 136,386           | 6,202322    | 4,547  |
|                        |                            | 131,595                       | 131,595             |                   |             |        |
|                        |                            | 136,598                       | 136,598             |                   |             |        |
|                        |                            | 144,904                       | 144,904             |                   |             |        |
|                        |                            | 139,445                       | 139,442             |                   |             |        |
| Tengah                 | 750,0                      | 739,704                       | 98,627              | 729,311           | 12,31461    | 1,688  |
|                        |                            | 728,374                       | 97,116              |                   |             |        |
|                        |                            | 708,548                       | 94,473              |                   |             |        |
|                        |                            | 733,818                       | 97,842              |                   |             |        |
|                        |                            | 736,114                       | 98,148              |                   |             |        |
| Tinggi                 | 1250,0                     | 1158,161                      | 92,652              | 1188,948          | 29,43688    | 2,475  |
|                        |                            | 1169,351                      | 93,548              |                   |             |        |
|                        |                            | 1196,475                      | 95,718              |                   |             |        |
|                        |                            | 1186,301                      | 94,904              |                   |             |        |
|                        |                            | 1234,451                      | 98,756              |                   |             |        |

- Contoh perhitungan *recovery* pada nikotin kadar 100 ng/mL replikasi pertama:

$$\begin{aligned}\% \text{ recovery} &= (C_f - C_u) \times 100/C_a \\ &= (129,3884 - 0) \times 100/100 \\ &= 129,3884\end{aligned}$$

- Contoh perhitungan koefisien korelasi pada nikotin kadar 100 ng/mL:

$$\begin{aligned}CV &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\ &= 6,202322 / (129,3884) \times 100\% \\ &= 4,7935\%\end{aligned}$$



Lampiran 4. Data Sampel

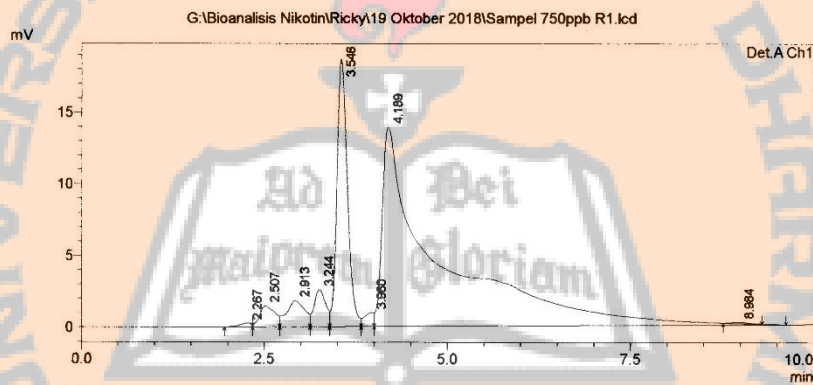
1. Konsentrasi 750 ppb replikasi 1

1/3/2019 09:57:44 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Ricky\19 Oktober 2018\Sampel 750ppb R1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Sampel 750ppb R1  
 Sample ID : Sampel 750ppb R1  
 Tray# : 1  
 Vial # : 11  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Sampel 750ppb R1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : batch 2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 10/19/2018 2:47:42 PM  
 Data Processed : 10/19/2018 4:10:26 PM

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/261nm

PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area    | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|---------|--------|------------|----------------|
| 1     | 2.267     | 2981    | 262    | 0.000      | 0.000          |
| 2     | 2.507     | 21086   | 1451   | 0.389      | 0.000          |
| 3     | 2.913     | 31163   | 1827   | 0.809      | 0.000          |
| 4     | 3.244     | 28328   | 2580   | 0.754      | 0.000          |
| 5     | 3.546     | 187319  | 18674  | 0.989      | 0.000          |
| 6     | 3.960     | 8636    | 970    | 0.461      | 0.000          |
| 7     | 4.189     | 747466  | 13907  | 0.223      | 0.000          |
| 8     | 8.984     | 1422    | 95     | 10.278     | 1.199          |
| Total |           | 1028401 | 39767  |            |                |



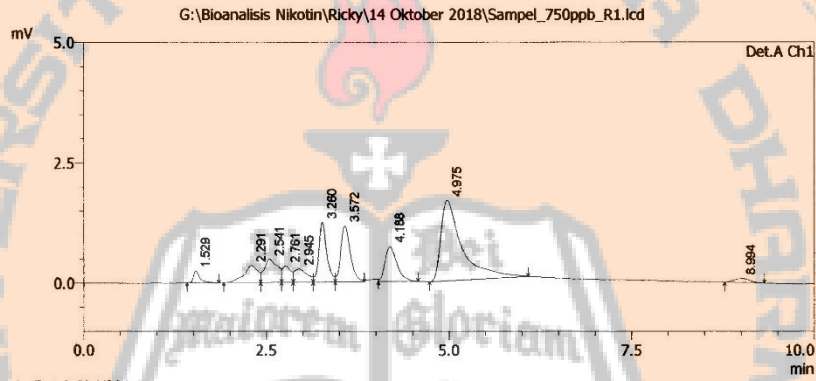
2. Konsentrasi 100 ppb replikasi 1

1/3/2019 10:00:19 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

G:\Bioanalisis Nikotin\Ricky\14 Oktober 2018\Sampel\_750ppb\_R1.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : Sampel\_750ppb\_R1  
 Sample ID : Sampel\_750ppb\_R1  
 Tray# : 1  
 Vail # : 11  
 Injection Volume : 100 uL  
 Data File Name : Sampel\_750ppb\_R1.lcd  
 Method File Name : Metode 70 30 flow 1.lcm  
 Batch File Name : BATCH SAMPEL\_COBA2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 10/14/2018 2:28:16 PM  
 Data Processed : 11/15/2018 4:46:06 PM


<Chromatogram>



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area  | Height | Resolution | Tailing Factor |
|-------|-----------|-------|--------|------------|----------------|
| 1     | 1.529     | 1484  | 243    | 0.000      | 2.168          |
| 2     | 2.291     | 4780  | 353    | 2.701      | 0.000          |
| 3     | 2.541     | 6060  | 481    | 0.534      | 0.000          |
| 4     | 2.761     | 2667  | 336    | 0.431      | 0.000          |
| 5     | 2.945     | 3280  | 272    | 0.348      | 0.000          |
| 6     | 3.260     | 9331  | 1255   | 0.818      | 0.000          |
| 7     | 3.572     | 10694 | 1170   | 1.404      | 0.000          |
| 8     | 4.188     | 8204  | 730    | 2.275      | 0.000          |
| 9     | 4.975     | 34066 | 1682   | 2.121      | 2.735          |
| 10    | 8.994     | 1274  | 83     | 9.263      | 1.184          |
| Total |           | 81790 | 6605   |            |                |

Lampiran 5. Nikotin



Certificate of Analysis

8.20877.0100 (-)-Nicotine for synthesis  
Batch S6196377

Assay (GC, area%):  
Density (d<sub>20</sub><sup>20</sup>/4 °C):  
Spec. rotation (α)<sub>D</sub> (20 °C, c=10.0):  
Identity (IR):

Date of examination (DD MM YYYY): 21.12.2015  
Minimum shelf life (DD MM YYYY): 31.12.2015

Dr. Wolfgang Bolkart  
responsible laboratory manager quality assurance

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany); +49 6151 72-0  
Page 1 of 1

Lampiran 6. Sampel Cairan Rokok Elektrik Merek “X”



## BIOGRAFI PENULIS



Penulis skripsi berjudul “Validasi *Metode High Performance Liquid Chromatography* Fase Terbalik pada Penetapan Kadar Nikotin dalam Cairan Rokok Elektrik Merek X” memiliki nama lengkap Ricky Davita Sutanto. Penulis lahir di Yogyakarta tanggal 1 Maret 1997 sebagai anak pertama dari dua bersaudara, dari pasangan Honda Sutanto dan Paramita Dewi. Pendidikan formal yang pernah ditempuh penulis adalah menyelesaikan pendidikan di TK Tarakanita Yogyakarta (2001-2003), SD Tarakanita Yogyakarta (2003-2009), SMP Stella Duce Yogyakarta (2009-2011), SMP Primagama Yogyakarta (2011-2012), dan SMA Bopkri I Yogyakarta (2012-2015). Penulis melanjutkan pendidikannya di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta pada tahun 2015. Selama menempuh pendidikan, penulis terlibat aktif dalam kegiatan kepanitiaan. Kegiatan kepanitiaan yang penulis ikuti antara lain, kepanitiaan Pemilihan Gubernur BEMF dan Ketua DPMF Farmasi tahun 2015, 2016, dan 2017 sebagai koordinator perlengkapan, kepanitiaan Lomba Cerdas Cermat Kimia 2016 sebagai sie perlengkapan, kepanitiaan *Pharmacy Performance* 2016 sebagai sie perlengkapan, kepanitiaan *Student Exchange Programme* 2016 sebagai sie akomodasi, kepanitiaan TITRASI 2017 sebagai sie perlengkapan, dan kepanitiaan FACTION #2 2017 sebagai sie konsumsi.