

Validasi Metode HPLC untuk Penetapan Aspirin dan Asam Salisilat dalam Plasma Kelinci (*Lepus curpaeums*) secara Simultan

By Agus Siswanto

4

Validasi Metode HPLC untuk Penetapan Aspirin dan Asam Salisilat dalam Plasma Kelinci (*Lepus curpaeums*) secara Simultan

5

Validation of A High Performance Liquid Chromatography Method for The Simultaneous Determination of Aspirin and Salisylic Acid In Rabbit (*Lepus curpaeums*) Plasma

4

Agus Siswanto, Achmad Fudholi, Akhmad Kharis Nugroho, Sudibyo Martono

Abstrak

Aspirin merupakan obat antinflamasi non steroid yang juga mempunyai efek antiplatelet untuk pencegahan stroke. Aspirin di dalam tubuh, sangat mudah terurai menjadi asam salisilat sebagai metabolit utama. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode penetapan kadar aspirin bersama-sama dengan asam salisilat dalam plasma menggunakan HPLC. Validasi metode analisis meliputi uji kesesuaian sistem, uji linearitas, penentuan LOD dan LOQ, penentuan perolehan kembali, akurasi, dan presisi. Kadar analit ditetapkan dengan HPLC menggunakan asam benzoat sebagai standar internal, dengan kondisi kolom Purospher Star RP-18 Endcapped (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), fase gerak asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (30:70 v/v), volume injeksi 20 μ L, kecepatan alir 1,5 mL/menit, dan detektor UV-Vis pada panjang gelombang UV 230 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang diusulkan memenuhi persyaratan kesesuaian sistem dan linearitas yang baik ($r > 0,990$) dengan LOQ (aspirin = 0,024 μ g/mL, asam salisilat = 0,336 μ g/mL) dan LOD (aspirin = 0,007 μ g/mL, asam salisilat = 0,101 μ g/mL). Metode analisis memberikan perolehan kembali 85-115%, akurasi, dan presisi sesuai persyaratan untuk bioanalisis dengan CV < 5 %. Dengan demikian, metode yang diusulkan dapat digunakan untuk menetapkan kadar aspirin dan asam salisilat dalam plasma.

Kata kunci: Aspirin; Asam salisilat; Validasi metode; HPLC

Abstract

Aspirin is a nonsteroidal anti-inflammatory drug which also has the effect of antiplatelet for stroke prevention. Aspirin inside human body is very easy to break down into salicylic acid as the main metabolite. The aim of this study is to develop and validate the method for determining aspirin and salicylic acid concentration in plasma by HPLC. Method validation including system suitability test, linearity test, determination of LOD and LOQ, recovery, accuracy and precision. Concentration of analytes in blood is measured by HPLC using benzoic acid as internal standard, with condition Purospher column Endcapped Star RP-18 (250 x 4.6 mm id, 5 μ m) acetonitrile : buffer phosphate 20 mM pH 2.5 (30:70 v/v) as mobile phase, injection volume 20 μ L, flow rate 1.5 mL/minute, and UV-Vis detector λ 230 nm. The results showed that the proposed method meets the requirements of system suitability and good linearity ($r > 0.990$) with LOQ (aspirin = 0.024 mg/mL, salicylic acid = 0.336 mg/mL) and LOD (aspirin = 0.007 mg/mL, salicylic acid = 0.101 mg/mL). The method of analysis provides recovery of 85-115 %, accuracy and precision in accordance with the requirements for bioanalytical with CV < 5 %. Therefore, the proposed method is applicable to determine of aspirin and salicylic acid concentration in plasma.

Keywords: Aspirin; Salicylic acid; Method validation; HPLC

PENDAHULUAN

Aspirin merupakan obat analgesik, anti-inflamasi dan antipiretik yang sangat luas penggunaannya. Dalam dosis rendah, aspirin digunakan sebagai zat antitrombosis untuk mencegah agregasi platelet melalui penghambatan enzim siklooksigenase. Oleh karena itu, pemantauan asam salisilat sebagai metabolit utama dalam darah bersama-sama aspirin sangat diperlukan untuk menentukan profil farmakokinetik aspirin.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan beberapa parameter validasi penentuan kadar aspirin dan asam salisilat dengan metode HPLC serta kemanfaatannya pada uji farmakokinetik aspirin setelah diberikan secara intravena.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang dilakukan di laboratorium kimia analisis dan farmakologi-toksikologi Fakultas Farmasi UMP (Universitas Muhammadiyah Purwokerto) pada tahun 2014. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan kaji etik (Ethical Approval) nomor 201/KEC-LPPT/XI/2014 dari Komite Ethical Clearance Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM.

Alat dan bahan

Bahan yang digunakan meliputi asam benzoat, asam salisilat, etanol absolut, KH_2PO_4 , HPO_3 , asam perklorat 60 %, dan kalium oksalat (derajat analisa, Merck). Asetonitril LiChrosolv dan metanol LiChrosolv (pro HPLC, Merck). Aspirin (working standard, PT. Bintang Toedjoe), N_2 cair (Samator), kelinci jantan (*Lepus curpaeums*) dengan bobot 3-3,5 kg sebanyak 3 ekor, dietil eter (derajat analisa, Univar), dan akuabides (PT Widatra Bhakti). Alat yang digunakan meliputi HPLC Shimadzu (LC-10ATVP, SPD-10A VP, SCL-10A VP), kolom HPLC (LiChroCART 250×4,6 mm Purospher Star RP-18 Endcapped 5 μm , Merck), mikropipet 10-100 μL (Socorex), mikropipet 100-1000 μL (Socorex), neraca analitik (Shimadzu ATX 224 dan AUW 220D), pH meter (Metrohm), eppendorf centrifuge 5418, jarum suntik 1 mL, mikrotube (Eppendorf), autovortex SA5 (Stuart scientific), sonikator (Branson 1510), Haier Deep freezer. Pembuatan larutan dapar fosfat 20 mM KH_2PO_4 sebanyak 2,7216 g dilarutkan ke dalam 1,0 L akuabides. Untuk mendapatkan pH yang sesuai (3,5-2,5), ditambahkan larutan asam ortho-fosfat secukupnya dibantu dengan pH meter.

Pembuatan larutan induk sampel

Larutan induk aspirin, asam salisilat, dan asam benzoat disiapkan dengan menimbang masing-masing 10 mg aspirin, 10 mg asam salisilat, dan 10 mg asam benzoat. Masing-masing zat dimasukkan ke

dalam 3 labu takar 10,0 mL yang berbeda, ditambahkan asetonitril sampai tanda batas, dan dikocok hingga larut.

Penentuan sistem HPLC

Untuk memperoleh derajat pemisahan (R_s) yang baik untuk aspirin, asam salisilat, dan asam benzoat maka dikembangkan penggunaan beberapa fase gerak, yaitu pertama metanol : asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 3,5 dengan perbandingan 15:15:70; 10:20:70; dan 0:30:70 v/v, dan kedua menggunakan asetonitril : dapar fosfat 20 mM (30 : 70 v/v) dengan variasi pH dapar fosfat 20 mM yaitu: 3,5; 3,0; dan 2,5. Analisis sampel dengan HPLC menggunakan kolom LiChroCART 250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m, Purospher Star RP-18 Endcapped (Merck), volume injeksi 20 μ L, kecepatan alir 1,5 mL/menit, dan detektor UV-Vis λ 230 nm.

Uji kesesuaian sistem

Larutan sampel campuran aspirin, asam salisilat, dan asam benzoat dengan konsentrasi masing-masing 10 μ g/mL dalam pelarut asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (2:7) diinjeksikan sebanyak 6 kali ke dalam sistem HPLC dengan fase gerak asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (30:70 v/v).

Penyiapan plasma

Kelinci diaklimatisasi selama 2 minggu dan dipuaskan 12 jam sebelum dipakai dalam percobaan. Darah sebanyak 1,0 mL diambil dari vena marginalis kelinci dan ditampung dalam mikrotube yang mengandung 2,67 mg NaF dan 0,1 mL kalium oksalat 2 %. Darah divortex selama

10 detik, kemudian disentrifugasi pada kekuatan 10000 xg selama 10 menit sehingga diperoleh bagian plasma.

Penentuan Kurva baku

Larutan sampel untuk penentuan kurva baku (12 seri kadar) dibuat dari campuran analit aspirin dan asam salisilat serta asam benzoat sebagai standar internal. Masing-masing larutan seri kadar ditambah 250 μ L plasma kelinci, dan 20 μ L asam perklorat 17,5 %, divortex 10 detik, ditambah 1,0 mL dietil eter, divortex 3 menit. Larutan sampel disentrifugasi pada kekuatan 12000 xg selama 3 menit sehingga diperoleh fase organik (bagian atas). Fase organik diambil seluruhnya dan ditempatkan dalam vial, kemudian diuapkan di bawah aliran gas N_2 . Residu yang diperoleh direkonstitusi dengan pelarut asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (2:7) sebanyak 1000 μ L sehingga

diperoleh kadar aspirin (0,06; 0,10; 0,20; 0,30; 0,50; 0,70; 1,01; 1,31; 1,51; 2,01; 3,02; 4,02 μ g/mL), kadar asam salisilat (0,06; 0,10; 0,50; 1,01; 2,01; 3,02; 4,02; 5,03; 7,55; 10,06; 12,07; dan 15,09 μ g/mL) dan kadar asam benzoat 1,00 μ g/mL. Seri kadar larutan dibuat dalam 3 kali replikasi.

Sampel diinjeksikan ke sistem HPLC. Linearitas kurva baku ditentukan berdasarkan hubungan antara kadar sampel versus perbandingan luas area kromatogram aspirin atau asam salisilat terhadap asam benzoat.

Penentuan selektifitas

Penentuan selektivitas metode dilakukan dengan membandingkan kromatogram aspirin, asam salisilat, dan asam benzoat dalam darah (spike) dan blanko. Perolehan kembali, akurasi, dan presisi Preparasi sampel dilakukan sesuai prosedur pada pembuatan kurva baku sehingga diperoleh larutan campuran analit dalam 3 level kadar yaitu: level rendah (0,2 µg/mL aspirin, 0,50 µg/mL asam salisilat, 1,00 µg/mL asam benzoat), level sedang (1,01 µg/mL aspirin, 10,06 µg/mL asam salisilat, 1,00 µg/mL asam benzoat), level tinggi (1,51 µg/mL aspirin, 15,09 µg/mL asam salisilat, 1,00 µg/mL asam benzoat) dalam pelarut asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (2:7). Larutan level rendah dan level tinggi dibuat dalam 3 kali replikasi. Larutan level sedang dibuat dalam 6 kali replikasi. Sampel diinjeksikan ke sistem HPLC.

Penetapan kadar aspirin dan asam salisilat dalam plasma

Sampel darah kelinci dipreparasi se- bagaimana prosedur penyiapan plasma. Tidak lebih dari 60 menit, plasma segera diekstraksi sesuai prosedur penetapan kurva baku. Sampel disimpan dalam freezer padasuhu -40°C. Tidak lebih dari 12 jam setelah penyimpanan, sampel beku dicairkan dalam wadah penangas es, kemudian diinjeksikan ke dalam HPLC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Asam benzoat digunakan sebagai standar internal dalam proses ekstraksi sampel plasma. Oleh karena itu, diperlukan uji validitas metode analisis aspirin dan asam salisilat dalam plasma dengan beberapa tahapan untuk mendapatkan metode analisis yang sesuai, antara lain: pemilihan komposisi fase gerak dan kolom yang sesuai, metode ekstraksi yang tepat, dan validasi metode analisis yang diusulkan.

Penggunaan standar internal dalam preparasi sampel yang rumit dan panjang diperlukan untuk untuk mengkoreksi sampel yang hilang selama preparasi. Dengan memperhatikan polaritas analit aspirin dan asam salisilat maka kebanyakan peneliti menggunakan senyawa asam sebagai standar internal seperti asam p-toluat, asam benzoat dan senyawa analognya.³ Dalam proses ekstraksi ini dipilih asam benzoat sebagai standar internal. Penggunaan asam benzoat sebagai standar internal memberikan hasil yang memuaskan karena: kromatogram terpisah sempurna dari peak aspirin dan asam salisilat ($R_s > 2$), TR asam benzoat (6,86 menit) dekat dengan aspirin (5,85 menit) dan asam salisilat (8,53 menit), dapat me-mimic analit pada tiap tahap preparasi sampel karena asam benzoat mempunyai polaritas yang mirip analit, dan memiliki respon terhadap detektor UV serupa dengan respon analit pada λ 230 nm.

Penentuan komposisi fase gerak

Guna mendapatkan derajat pemisahan (R_s) yang baik untuk aspirin, asam salisilat, dan asam benzoat maka dikembangkan penggunaan beberapa fase gerak yang sesuai. Pemilihan fase gerak yang sesuai dilakukan berdasarkan 2 indikator yaitu $R_s > 2$ dan waktu retensi yang pendek (< 10 menit). Beberapa komposisi fase gerak yang digunakan yaitu kombinasi metanol, asetonitril, dan dapar fosfat 20 mM pH 2,5- 3,5 (Tabel 1). Kromatogram analit secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 1. Pada tahap pertama digunakan fase gerak metanol : asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 3,5 dengan komposisi metanol : asetonitril yang divariasikan. Dalam komposisi fase gerak ini, meskipun asam salisilat mempunyai kelarutan yang lebih rendah (1:550) dibandingkan asam benzoat (1:350) dan aspirin (1:300)¹³, namun asam salisilat mempunyai waktu retensi (TR) paling pendek diikuti oleh aspirin dan asam benzoat. pH dapar fosfat dalam fase gerak mempengaruhi terjadinya disosiasi sehingga mempengaruhi polaritas analit. Asam salisilat ($pK_a = 3$) dengan pH 3,5 lebih banyak berada dalam bentuk terionkan sehingga meningkat kelarutannya dalam fase gerak yang relatif polar. Asam benzoat ($pK_a = 4,2$) lebih banyak berada dalam bentuk molekul, sehingga lebih bersifat non polar. Sementara itu, aspirin berada dalam persentase yang seimbang antara bentuk molekul dan terionkan. Oleh karena itu, dalam kolom C18 secara berturut-turut TR analit adalah asam salisilat, aspirin, dan asam benzoat

Pada pH fase gerak yang lebih rendah (2,5) secara berturut-turut TR kromatogram aspirin (5,85 menit), asam benzoat (6,86 menit), dan asam salisilat (8,53 menit). Ketiga senyawa pada pH yang lebih rendah yaitu 2,5 ($< pK_a$ aspirin = 3,5; pK_a asam benzoat = 4,2; pK_a asam salisilat = 3,0) cenderung berada dalam bentuk tak terionkan (utuh) sehingga lebih bersifat non polar. Oleh karena itu, TR analit lebih dipengaruhi oleh kelarutan ketiga senyawa. Aspirin dengan kelarutan 1 : 300 yang bersifat lebih polar elusi terlebih dahulu dibandingkan asam benzoat (1 : 350) dan asam salisilat (1 : 550).

Kondisi pemisahan terbaik diperoleh pada pH 2,5 yang memberikan R_s ketiga senyawa > 2 dan TR < 10 menit. Sementara itu pada pH 3,0, asam salisilat dan asam benzoat terelusi pada TR yang sama yaitu 6,99 menit sebagaimana tampak pada gambar 1d. Hal ini terjadi karena pada kondisi ini kemungkinan kedua senyawa mempunyai sifat polaritas yang mirip. Meskipun kelarutan asam salisilat (1:550) lebih rendah dibandingkan asam benzoat (1:350) namun kecepatan disosiasi asam salisilat ($pK_a = 3,0$) pada pH 3,0 lebih besar dibandingkan asam benzoat ($pK_a = 4,2$). Pengaruh simultan kelarutan dan kecepatan disosiasi mengakibatkan asam salisilat dan asam benzoat mempunyai polaritas yang mirip sehingga terelusi pada TR yang hampir sama.

Kesesuaian sistem HPLC

Hasil uji kesesuaian sistem HPLC menunjukkan bahwa parameter-parameter yang diukur memenuhi kriteria untuk dapat diterima yaitu nilai simpangan baku relatif dari waktu retensi $\leq 1\%$, As (asymmetry factor) < 2 , N (number of theoretical plates) > 2000 dan Rs (resolution) > 2 sebagaimana tersaji pada Tabel 2.14 Hal ini berarti bahwa sistem HPLC yang digunakan dalam penetapan kadar analit dalam darah dapat menghasilkan data dengan kualitas yang dapat diterima.

Selektivitas

Pada penetapan kadar obat dalam cairan hayati, selektivitas metode merupakan hal yang sangat penting karena harus dapat membedakan obat yang dimaksud dari metabolitnya, obat lain, dan kandungan endogen cairan hayati. Penentuan selektivitas dilakukan dengan membandingkan kromatogram darah blanko dan kromatogram plasma yang di-spike. Pada sampel blanko, tidak ada kromatogram yang muncul disekitar waktu retensi aspirin, asam benzoat, dan asam salisilat (6-10 menit). Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada gangguan respon senyawa endogen dalam plasma terhadap kromatogram analit. Sementara itu, pada kromatogram analit plasma yang dikenai spiking, muncul puncak di sekitar waktu retensi analit. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa metode analisis memenuhi syarat selektivitas.

Kurva baku aspirin dan asam salisilat

Kurva baku merupakan acuan dalam penetapan kadar obat dalam plasma darah. Ketidaktepatan dalam pembuatan kurva baku akan menimbulkan kesalahan sistemik dalam penentuan kadar sampel. Linieritas metode analisis merupakan kemampuan untuk memberikan hasil uji yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel.

Kadar obat dalam cairan hayati mempunyai rentang kadar yang lebar berkisar dari rendah ke tinggi. Oleh karena itu, penentuan kurva baku dibuat dalam 12 seri kadar yaitu aspirin = 0,10-4,02 $\mu\text{g/mL}$ dan asam salisilat = 0,10-15,09 $\mu\text{g/mL}$. Linieritas kurva baku ditentukan dengan memplotkan hubungan antara konsentrasi analit versus perbandingan luas area analit terhadap standar internal asam benzoat (Tabel 3).

Untuk mendapatkan keterulangan yang baik maka kurva baku dibuat dalam 3 kali replikasi. Ketiga kurva baku memenuhi kriteria linearitas yang baik dengan nilai $r > 0,765$ ($p=0,001$; $n=10$; derajat bebas=2). Artinya perubahan kadar analit sebanding dengan perubahan respon kromatogram. Kurva baku yang baik ditentukan berdasarkan nilai r yang paling tinggi, intersep (a) yang paling rendah, dan kemiringan (b) yang paling besar dari garis $y = bx + a$. Oleh karena itu, dalam hal ini kurva baku terbaik ditunjukkan oleh kurva baku aspirin replikasi ke-1 dan kurva baku asam salisilat replikasi ke-2.

LOD dan LOQ

Metode analisis untuk analisis sampel biologis harus mempunyai sensitivitas yang tinggi agar mampu mengukur kadar obat utuh yang berada dalam sampel hayati.⁶ Tidak pekanya suatu metode analisis dapat berakibat tidak terpanjanya kadar obat yang rendah selama fase absorpsi dan eliminasi, sehingga dapat menimbulkan kesalahan dalam penetapan model dan nilai parameter farmakokinetik.⁶ LOD dan LOQ merupakan parameter sensitivitas suatu metode. Pada penelitian ini, nilai LOD dan LOQ dianalisis secara statistik melaluipersamaan regresi linear kurva baku pada kadar aspirin 0,10- 1,01 µg/mL dan asam salisilat 0,10-4,02 µg/mL. Dalam sampel plasma, aspirin dan asam salisilat berada pada konsentrasi rendah. Oleh karena itu, diperlukan metode analisis dengan LOD dan LOQ yang rendah agar dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi analit. Sensitivitas metode untuk aspirin terlihat dari perolehan nilai LOD = 0,007 µg/mL dan LOQ = 0,024 µg/mL. Sementara itu, untuk asam salisilat memberikan perolehan nilai LOD = 0,101 µg/mL dan LOQ = 0,336 µg/mL.

Perolehan kembali, akurasi, dan presisi Hasil uji perolehan kembali tersaji pada

tabel 4. Metode analisis HPLC untuk aspirin dan asam salisilat memberikan akurasi yang baik dengan nilai perolehan kembali 85- 115% pada 3 level kadar.^{6,17} Sementara itu, nilai CV perolehan kembali untuk tiap level konsentrasi tidak lebih dari 5%. Artinya metode analisis yang digunakan cukup handal untuk menentukan kadar analit dalam plasma mendekati nilai sebenarnya. Salah satu faktor yang mempengaruhi akurasi metode ini adalah proses ekstraksi analit dari plasma. Prosedur ekstraksi yang cukup panjang dapat mempengaruhi persen perolehan kembali analit. Sampel darah ditampung dalam mikrotube yang mengandung kalium oksalat dan NaF. Plasma dipisahkan dari darah sampel dengan sentrifugasi (10000 xg).

Penambahan asam perklorat 17,5% dilakukan untuk mengendapkan protein plasma dan mengasamkan sampel hingga pH = 1,18. Sampel dikondisikan pada pH rendah untuk meningkatkan stabilitas analit (asam salisilat, asam benzoat, dan aspirin). Partisi analit ke dalam dietil eter terjadi dengan baik. Hal ini terjadi karena kelarutan ketiga analit yang cukup tinggi dalam dietil eter (aspirin 0,262 M; asam salisilat 1,5 M; asam benzoat 1,816 M). Vortex selama 3 menit dilakukan untuk mencampur sampel dan menarik analit ke dalam fase organik (dietil eter). Fase organik diuapkan di bawah aliran gas N₂ untuk menghindari hidrolisis aspirin dalam udara bebas. Residu direkonstitusi dengan fase gerak dan disimpan beku (-40°C) hingga analisis HPLC dilakukan untuk menghindari degradasi aspirin.

¹ Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) dan dinyatakan sebagai keterulangan (repeatability) atau ketertiruan (reproducibility).²⁰ Penelitian ini hanya menetapkan keterulangan saja sebagai parameter presisinya. Metode analisis HPLC untuk aspirin dan asam salisilat mempunyai nilai presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi (CV) < 5 %.⁶ Oleh

karena itu, dapat disimpulkan bahwa metode pengukuran aspirin dan asam salisilat ini telah memenuhi syarat validitas metode bioanalisis.

Profil farmakokinetik aspirin setelah pemberian secara intravena

Metode HPLC untuk analisis aspirin dan asam salisilat digunakan pada penetapan kadar analit setelah pemberian larutan aspirin secara intravena pada kelinci. Kurva profil farmakokinetik aspirin yang diberikan secara intravena tersaji pada Gambar 3. Pada menit awal kadar aspirin dalam darah sangat tinggi, namun segera mengalami penurunan kadar yang sangat tajam karena sebagian besar aspirin mengalami hidrolisis menjadi asam salisilat setelah pemberian secara intravena. Gambar 3 menunjukkan bahwa penurunan kadar aspirin diikuti dengan kenaikan kadar asam salisilat dalam darah. Bahkan asam salisilat merupakan senyawa yang lebih dominan di dalam darah dibandingkan aspirin.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode HPLC untuk analisis aspirin dan asam salisilat yang diusulkan memenuhi persyaratan kesesuaian sistem dan linieritas yang baik. Metode analisis memberikan perolehan kembali, akurasi, dan presisi sesuai persyaratan untuk bioanalisis dengan CV < 5 %. Dengan demikian, metode yang diusulkan dapat digunakan untuk menetapkan kadar aspirin dan asam salisilat dalam plasma.

Validasi Metode HPLC untuk Penetapan Aspirin dan Asam Salisilat dalam Plasma Kelinci (*Lepus curpaeums*) secara Simultan

ORIGINALITY REPORT

16%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	ar.scribd.com Internet	204 words — 7%
2	www.hajarfisika.com Internet	48 words — 2%
3	docobook.com Internet	35 words — 1%
4	www.scilit.net Internet	25 words — 1%
5	id.123dok.com Internet	22 words — 1%
6	www.jmcs.org.mx Internet	16 words — 1%
7	Dewi Susanna, Zakianis Zakianis, Ema Hermawati, Haryo Kuntoro Adi. "The using of <i>Spirulina platensis</i> as Supplement of Single-Celled Protein (SCP) to Mice", <i>Makara Journal of Health Research</i> , 2010 Crossref	14 words — < 1%
8	jfonline.org Internet	13 words — < 1%
9	Firmin Semboung Lang, Jacqueline Destain, Frank Delvigne, Philippe Druart, Marc Ongena, Philippe Thonart. "Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in	12 words — < 1%

Mangrove Sediments Under Different Strategies: Natural Attenuation, Biostimulation, and Bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1", Water, Air, & Soil Pollution, 2016

Crossref

-
- | | | |
|-----------|---|-----------------|
| 10 | Yasunori Sato, Yoshiaki Kawashima, Hirofumi Takeuchi, Hiromitsu Yamamoto. "In vitro evaluation of floating and drug releasing behaviors of hollow microspheres (microballoons) prepared by the emulsion solvent diffusion method", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004 | 12 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 11 | www.mz-at.de
<small>Internet</small> | 11 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 12 | yz-car.ci.cqvip.com
<small>Internet</small> | 10 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 13 | www.scielo.br
<small>Internet</small> | 9 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 14 | etheses.uin-malang.ac.id
<small>Internet</small> | 9 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 15 | www.omicsonline.org
<small>Internet</small> | 9 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 16 | repositorio.unesp.br
<small>Internet</small> | 9 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 17 | baliate.blogspot.com
<small>Internet</small> | 8 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 18 | pasca.unhas.ac.id
<small>Internet</small> | 8 words — < 1% |
| <hr/> | | |
| 19 | Guoqiang Ai, Rakesh Dachineni, Pratik Muley, Hemachand Tummala, G. Jayarama Bhat. "Aspirin and salicylic acid decrease c-Myc expression in cancer cells: a potential role in chemoprevention", Tumor Biology, 2015 | 6 words — < 1% |

EXCLUDE QUOTES	ON	EXCLUDE MATCHES	OFF
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY	ON		