

Validasi Metode Analisis Total Flavonoid dalam Ekstrak Etanol Sirih Merah (*Piper crocatum* var. Ruiz & Pav) dengan Spektrofotometer Nano BMG Lab. Tech.

Martini Hudayanti^{*}, Elitawati Sarah, Popi Asri Kurniatin

Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor University, Bogor
Corresponding Author: martinihu@apps.ipb.ac.id

Received: 22th May 2025; Revised: 23th June 2025; Accepted: 24th June 2025;

Available online: 4th July 2025; Published regularly: July 2025

Abstract

Method validation is a crucial step when an analytical method is applied using different instruments to ensure the accuracy, precision, and reliability of the results. This study aimed to validate the method for determining the total flavonoid content in the 70% ethanol extract of red betel leaves (*Piper crocatum*) using a BMG LAB.TECH nanospectrophotometer equipped with a 96-well plate. This method offers advantages in terms of time efficiency and sample volume compared to conventional spectrophotometric techniques. The validation parameters assessed included linearity, precision, accuracy, limit of detection (LoD), and limit of quantitation (LoQ). The results demonstrated excellent linearity with a correlation coefficient (r) of 0.997. Precision testing yielded a relative standard deviation (%RSD) of 2.65%, while accuracy testing showed an average recovery rate of 104.33%. The LoD and LoQ were calculated to be 4.06 ppm and 13.52 ppm, respectively. Based on these findings, the total flavonoid content in the ethanol extract of the red betel leaves was determined to be 24.30 mg QE/g. Because the method meets the validation criteria outlined in the ICH guidelines, it is considered valid and suitable for use in educational laboratory activities and scientific research applications.

Key Words : Flavonoid, Extraction, Method validation, Nanospectrophotometer, Red betel leaf

Abstrak

Validasi metode merupakan hal penting yang harus dilakukan ketika suatu metode analisis menggunakan instrumen yang berbeda untuk menjamin akurasi, presisi, dan keandalan hasil pengukurannya. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode pengukuran kadar total flavonoid dalam ekstrak etanol 70% daun sirih merah (*Piper crocatum*) menggunakan spektrofotometer nano BMG LAB.TECH yang dilengkapi pelat 96-well. Metode ini dinilai lebih efisien dalam hal waktu analisis dan volume sampel yang digunakan dibandingkan dengan spektrofotometer UV-Vis biasa. Parameter validasi yang diuji yaitu linearitas, presisi, akurasi, limit deteksi (LoD), dan limit kuantitasi (LoQ). Hasil pengujian menunjukkan bahwa metode ini memiliki linearitas yang sangat baik dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,997. Uji presisi menghasilkan nilai persentase simpangan baku relatif (%RSD) sebesar 2,65% dan uji akurasi menunjukkan rata-rata persen perolehan kembali (recovery) sebesar 104,33%. Nilai LoD dan LoQ masing-masing sebesar 4,06 ppm dan 13,52 ppm. Berdasarkan hasil tersebut, kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol sirih merah diperoleh sebesar 24,30 mg QE/g. Dengan memenuhi kriteria nilai validasi berdasarkan pedoman ICH, maka metode ini dinyatakan valid dan dapat diterapkan dalam kegiatan praktikum maupun penelitian di laboratorium.

Kata Kunci : Flavonoid, Ekstraksi, Spektrofotometer nano, Sirih merah, Validase metode

PENDAHULUAN

Penelitian ini dilatarbelakangi oleh banyaknya mahasiswa penelitian yang melakukan analisa penentuan kadar total flavonoid dalam ekstrak tanaman. Selain itu, terdapat mata kuliah praktikum yang memuat materi penentuan kadar total flavonoid. Validasi metode penentuan kadar total flavonoid yang selama ini menggunakan spektrofotometer nano belum dilakukan di laboratorium Biokimia. Pengukuran kadar flavonoid metode sebelumnya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan kuvet. Namun, metode ini kini telah beralih menggunakan spektrofotometer nano dengan *plate 96-well*, sehingga perlu dilakukan validasi. Menurut *International Conference on Harmonization* (ICH) suatu metode analisis harus divalidasi ketika metode baku dikerjakan dengan menggunakan alat yang berbeda. Validasi ini penting untuk memastikan bahwa metode standar yang sebelumnya diterapkan dengan spektrofotometer UV-Vis tetap memberikan hasil yang akurat dan andal ketika diterapkan dengan alat spektrofotometer nano (Chandra, 2023).

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet berada pada panjang gelombang 200–400 nm, sedangkan sinar tampak berada pada panjang gelombang 400–800 nm (Agustina *et al.*, 2020). Spektrofotometer UV-Vis (*ultra violet-visible*) adalah salah satu instrumen yang digunakan dalam menganalisa suatu senyawa kimia. Spektrofotometer digunakan karena kemampuannya dalam menganalisa banyak senyawa kimia serta kepraktisannya dalam hal preparasi sampel apabila dibandingkan dengan beberapa metode analisa. Instrumen spektrofotometer yang digunakan pada penelitian ini adalah SPECTROstar Nano dilengkapi dengan spektrometer UV/Vis ultra-cepat BMG LABTECH, yang memungkinkan pengguna mengukur absorbansi spektrum penuh (220–1000 nm) dalam waktu kurang dari 1 detik per sumur. Hal ini adalah instrumen yang ideal untuk membaca semua uji absorbansi dalam mikrotiter plate atau kuvet dengan banyak protokol uji umum yang telah ditentukan (Yunita *et al.*, 2020).

Sirih merah dipilih sebagai sampel pada penelitian ini untuk validasi metode pengujian kadar flavonoid dengan instrumen nanospektrofotometer. Sirih merah telah diketahui sebagai obat herbal dan fitofarmaka oleh masyarakat Indonesia. Masyarakat Indonesia sendiri telah memanfaatkan tanaman ini secara empiris sebagai antiseptik, disinfektan, bahkan antikanker. Hal ini diduga berasal dari kandungan senyawa metabolit sekunder dari sirih merah, yang terdiri atas alkaloid, flavonoid, saponin, dan minyak atsiri. Senyawa ini diperoleh dari proses ekstraksi sirih merah yang dilanjutkan proses purifikasi untuk menghilangkan zat pengotor/ballast yang berdampak negatif pada senyawa metabolit sekunder tersebut. Adapun potensi sirih merah sebagai agen antioksidan telah dibuktikan oleh sejumlah penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa daun sirih merah mengandung metabolit sekunder flavonoid dengan aktivitas antioksidan. Senyawa flavonoid diketahui mampu menangkap radikal bebas disebabkan memiliki struktur berupa sejumlah cincin benzen (Chairunnisa *et al.*, 2022).

Salah satu senyawa kimia yang terkandung di dalam daun sirih merah yaitu flavonoid. Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga dapat ditemukan pada setiap ekstrak tumbuhan (Agati *et al.*, 2020). Flavonoid merupakan salah satu senyawa antioksidan golongan fenolik alam yang terbesar dan terdapat dalam semua tumbuhan (Wahyuningtyas *et al.*, 2025). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mendonorkan proton kepada senyawa radikal bebas, sehingga tidak terjadi reaksi lebih lanjut yang berbahaya (Kurniasari *et al.*, 2024).

Jumlah kandungan total senyawa flavonoid dilakukan analisis kuantitatif yaitu dengan metode pereaksi AlCl_3 secara spektrofotometri UV-Vis dan kadarnya dinyatakan sebagai *Quercetin Equivalent* (QE). Alat yang digunakan untuk pengukuran pada metode ini adalah spektrofotometer nano. Keunggulan alat ini dapat membaca sampai 96 sampel dalam sekali pengukuran, sehingga tidak memerlukan waktu yang lama, volume yang digunakan lebih sedikit (300 μL) dibandingkan dengan menggunakan kuvet (1-3 mL), sehingga dapat menghemat sampel/ekstrak dan reagen yang digunakan (Ramos *et al.*, 2017).

Perlunya validasi metode untuk menentukan apakah seluruh tahap pengujian telah memenuhi standar yang ditetapkan. Hasil uji yang akurat adalah pencerminan dari pelaksanaan yang baik dari seluruh tahapan pengujian, maka validasi metode dilakukan dengan cara menguji akurasi hasil analisis yang (Nugroho & Alrayan, 2024). Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap suatu parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk memastikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Chandra, 2023). Parameter validasi yang ditetapkan pada penelitian ini antara lain linearitas, *limit of detection* (LoD), *limit of quantitation* (LoQ), presisi, dan akurasi.

Penelitian sebelumnya Cong-Hau et al. (2021) memvalidasi metode spektrofotometri untuk penentuan kandungan flavonoid total dalam produk teh. Mereka menggunakan kuersetin sebagai standar dengan rentang linearitas 50–700 mg QE/L dan koefisien determinasi $R^2 = 0,9981$. Metode ini menunjukkan presisi yang baik ($RSD < 1,2\%$) dan akurasi dengan recovery 98–102%, mendukung klaim tentang linearitas dan sensitivitas tinggi dalam analisis flavonoid. Rustamsyah et al. (2023) juga melaporkan hasil serupa dalam analisis senyawa fenolik menggunakan SPECTROstar Nano dengan linearitas sempurna ($R^2 = 0,999$), LoD 1,2 ppm, dan LoQ 4,0 ppm, sekaligus memvalidasi presisi (%RSD $< 3\%$) dan akurasi (recovery 97–103%). Penelitian Zhao et al. (2022) membandingkan profil fitokimia dan aktivitas biologis dari daun teh yang diperoleh dari kultivar yang sama. Studi ini menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk analisis kandungan flavonoid, menunjukkan aplikasi metode ini dalam analisis cepat senyawa bioaktif. Zou et al. (2022) membahas aplikasi spektroskopi dalam analisis flavonoid dari bahan makanan dan obat. Teknologi nano dan sensor fluoresen berbasis nanomaterial telah meningkatkan sensitivitas dan efisiensi dalam analisis flavonoid, sehingga mendukung klaim tentang keunggulan spektrofotometer nano dibandingkan metode konvensional. Temuan-temuan ini memperkuat posisi spektrofotometer nano sebagai alat analisis yang unggul dalam aspek linearitas, sensitivitas (LoD/LoQ), dan efisiensi, yang sejalan dengan hasil penelitian pada ekstrak sirih merah dalam studi ini, sekaligus menegaskan kebaruannya dalam konteks aplikasi pendidikan dan analisis matriks tanaman yang spesifik.

Kebaruan penelitian ini terletak pada penggunaan spektrofotometer nano (BMG LABTECH) dengan 96-well plate yang memungkinkan analisis *high-throughput* (96 sampel sekaligus) dengan volume sampel minimal (300 μ L) dan waktu pengukuran lebih cepat (< 1 detik/sumur). Metode ini divalidasi secara komprehensif dengan parameter linearitas ($R^2 = 0,997$), presisi (%RSD 2,65%), akurasi (recovery 104,33%), LoD 4,06 ppm, dan LoQ 13,52 ppm, sesuai pedoman ICH. Selain itu, penelitian ini mengisi gap literatur tentang aplikasi spektrofotometer nano dalam konteks pendidikan, menyediakan protokol standar untuk praktikum laboratorium dan penelitian lanjutan. Oleh karena itu, penelitian ini tidak hanya memvalidasi metode yang sudah ada tetapi juga memperkenalkan pendekatan inovatif yang lebih praktis dan *scalable* untuk analisis flavonoid. Validasi ulang perlu dilakukan meskipun validasi sebelumnya menghasilkan data yang sesuai dengan kriteria penerimaan, karena metode yang dinyatakan valid pada kondisi tertentu belum tentu valid pada kondisi lain karena peralatan dan pereaksi yang digunakan, analisis yang mengerjakan dan sebagainya (Yunita et al., 2020).

Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode pengukuran kadar total flavonoid dalam ekstrak etanol 70% daun sirih merah (*Piper crocatum*) menggunakan spektrofotometer nano BMG LABTECH yang dilengkapi dengan pelat 96-well untuk menjamin keakuratan, presisi, dan keandalan hasil analisis. Penelitian dirancang menguji parameter validasi metode sesuai pedoman *International Conference on Harmonization* (ICH) yang mencakup evaluasi linearitas hubungan antara konsentrasi dan absorbansi, presisi melalui pengukuran berulang, akurasi, serta penentuan batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ). Penelitian ini juga bertujuan untuk membandingkan efisiensi metode spektrofotometer nano dengan teknik spektrofotometri UV-Vis konvensional, khususnya dalam hal volume sampel yang dibutuhkan (300 μ L vs 1–3 mL) dan waktu analisis yang lebih singkat berkat kemampuan pengukuran *high-throughput* 96 sampel sekaligus. Selain aspek metodologis penelitian ini juga ditujukan untuk menentukan kadar total flavonoid dalam ekstrak sirih merah asal Solo dan mengevaluasi potensinya sebagai bahan aktif herbal berdasarkan kandungan flavonoid yang terukur. Tujuan akhir penelitian ini

adalah menyediakan protokol standar yang telah tervalidasi untuk aplikasi dalam kegiatan praktikum laboratorium pendidikan dan penelitian lanjutan terkait analisis senyawa flavonoid.

BAHAN DAN METODE

Tahapan penelitian dimulai dari pembuatan ekstrak, pembuatan larutan standar kuersetin, larutan ekstrak sirih merah asal Solo, Jawa Tengah dan penentuan panjang gelombang maksimum pada rentang 400-500 nm menggunakan spektrofotometer nano (SPECTROstar Nano BMG LABTECH). Validasi metode dianalisis berdasarkan parameter linearitas, presisi, akurasi, serta nilai batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ).

Pembuatan Ekstrak Simplisia

Ekstrak simplisia dibuat berdasarkan metode yang dimodifikasi dengan mengacu pada penelitian Chairunisa et al. (2022), simplisia sirih merah diblender dan diayak dengan saringan 60 mesh. Setelah itu serbuk sirih merah diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan *shaker*. Simplisia direndam dalam pelarut dengan perbandingan 1:7 (b/v) dan kemudian digoyang dengan kecepatan agitasi rendah hingga sedang selama ± 24 jam. Setelah itu, rendaman simplisia disaring untuk diambil filtratnya. Ekstraksi dilakukan dengan dua kali ulangan dan lima kali pembilasan lalu, pemekatan dilakukan menggunakan rotary evaporator pada suhu $\pm 50^\circ\text{C}$, selanjutnya dioven pada suhu yang sama hingga semua pelarut menguap sehingga diperoleh ekstrak kering.

Pembuatan Larutan Standar Kuersetin dan Ekstrak Sirih Merah

Larutan standar kuersetin dibuat dalam stok 1000 ppm dengan etanol 70% dan dihomogenkan. Selanjutnya, dibuat pengenceran kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm. Dari konsentrasi 100 ppm kemudian dibuat pengenceran menjadi 5, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Selanjutnya, larutan ekstrak sirih merah dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm dengan pelarut etanol 70% dan dihomogenkan. Kemudian larutan dimasukan ke dalam botol dengan diberi label ekstrak etanol 70% konsentrasi 1000 ppm.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pengukuran Flavonoid

Penentuan panjang gelombang maksimum menggunakan larutan standar konsentrasi 250 ppm dan blanko (etanol 70%). Larutan standar ditambahkan dengan reagen aluminium klorida 10%, kalium asetat 1 M, dan akuades. Sampel dan semua reagen dimasukkan ke dalam microplate 96-well secara berurutan. Sampel kemudian diinkubasi dalam kondisi ruangan gelap dengan suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-500 nm menggunakan spektrofotometer nano (SPECTROstar Nano BMG LABTECH) dengan tiga kali pembacaan.

Pengujian Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis dilakukan dengan mengacu pada penelitian Rafi et al. (2018), adapun parameter yang digunakan meliputi linearitas, akurasi, presisi, serta batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ). Linearitas dilakukan menggunakan larutan standar kuersetin. Kurva hubungan antara kadar dan serapan dibuat, kemudian dapat diperoleh persamaan regresi linier serta koefisien korelasi. Presisi dilakukan dengan pengulangan penimbangan ekstrak sirih merah sebanyak 7x penimbangan. Uji presisi ditentukan dengan parameter RSD (*Relative Standard Deviation*). Akurasi dinyatakan dengan % *recovery* dari penambahan larutan standar yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam larutan ekstrak sirih merah. Nilai % akurasi dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Akurasi} = \frac{\text{konsentrasi pengukuran}}{\text{konsentrasi teori}} \times 100$$

Batas deteksi dan batas kuantitas dapat dihitung dengan menggunakan intersep dari kurva kalibrasi (S) dan standar deviasi (SD). LoD dan LoQ dinyatakan dalam satuan ppm dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{LoD} = \frac{3 \times \text{SD}}{\text{Slope}}$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{Slope}}$$

Sampel dari setiap paramater analisis validasi diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer nano (*SPECTROstarNano BMG LABTECH*).

Analisis Data

Analisis data menggunakan Microsoft Excel. Data yang diperoleh merupakan data primer yang didapatkan dari absorbansi larutan pembanding kuersetin kemudian dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear. Kadar total dari senyawa dihitung dengan melakukan plotting terhadap persamaan regresi linear $y = ax + b$, yang diperoleh dari kurva kalibrasi pembanding dan hasilnya dinyatakan dalam satuan mg/g. Hasil untuk kurva linearitas didasarkan pada tiga sampel ulangan dari setiap konsentrasi standar kuersetin. Regresi digunakan untuk mendapatkan persamaan linier dan nilai koefisien determinasi (R^2). Presisi didasarkan pada pengukuran satu konsentrasi dengan tujuh kali pengulangan dan dihitung nilai % RSD

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Ekstrak Sirih Merah

Sampel ekstrak sirih merah dipilih karena ekstrak tersebut sedang dikembangkan menjadi produk herbal dan dijadikan sampel percobaan pada materi praktikum Aplikasi Penelitian Biokimia. Serbuk simplisia daun sirih merah diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dipilih karena prosesnya sederhana dan dapat digunakan untuk senyawa yang tidak stabil dengan pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah etanol absolut bersifat polar yang melarutkan hampir semua senyawa metabolit sekunder dan hasil rendemen dua kali lebih tinggi daripada pelarut lain. Sel tumbuhan mengalami degradasi dinding sel oleh pelarut etanol yang menyebabkan keluarnya senyawa flavonoid sehingga senyawa flavonoid yang bersifat polar akan lebih banyak untuk terekstraksi (Yasa et al., 2019)

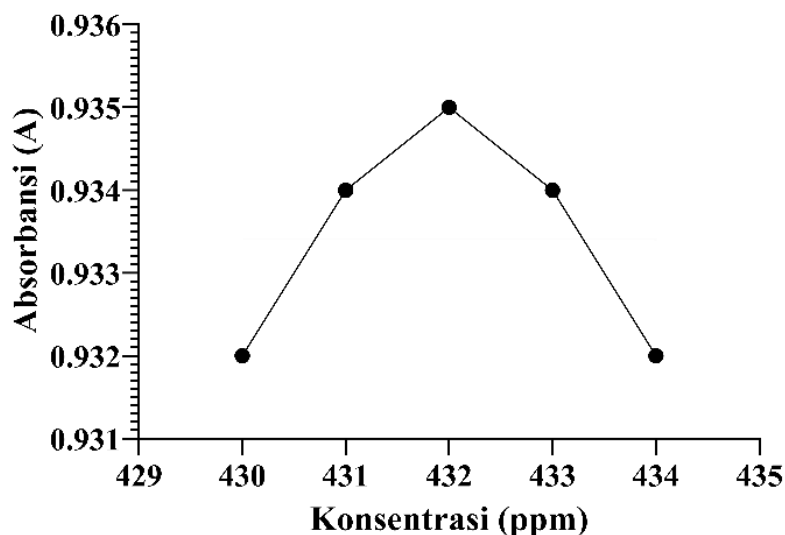
Tabel 1. Persen rendemen ekstrak sirih merah

Ulangan	Bobot simplisia sirih merah (g)	Bobot ekstrak sirih merah (g)	Rendemen (%)	Rata-rata	SD
1	15	2,3651	15,77	15,82	0,07731
2	15	2,3815	15,88		

Hasil ekstraksi simplisia sirih merah yang dilakukan dengan metode maserasi bergoyang menggunakan pelarut etanol absolut 70% menunjukkan persentase rendemen yang konsisten pada dua kali ulangan, masing-masing menghasilkan rendemen sebesar 15,77% dan 15,88% (Tabel 1). Rata-rata rendemen dari kedua ulangan ini adalah 15,82%, dengan standar deviasi sebesar 0,07731, yang menunjukkan bahwa variasi antara kedua hasil cukup rendah dan mendekati rata-rata. Angka ini mengindikasikan stabilitas proses ekstraksi yang baik, dengan tingkat keandalan yang tinggi dalam menghasilkan ekstrak sirih merah dengan rendemen yang serupa pada setiap kali ulangan. Dengan hasil ini, dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi ini efektif dan mampu menghasilkan ekstrak dalam jumlah yang optimal, sekitar 15,82% dari bobot simplisia yang diekstraksi (Tabel 1).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum untuk larutan standar kuersetin dilakukan untuk menentukan pada panjang gelombang mana absorbansi mencapai nilai tertinggi. Pengukuran ini dilakukan dengan mengamati hubungan antara panjang gelombang dan absorbansi, di mana rentang panjang gelombang yang diukur adalah antara 400-500 nm. Hasil menunjukkan bahwa absorbansi maksimum tercapai pada panjang gelombang 432 nm. Hal ini menunjukkan bahwa panjang gelombang 432 nm merupakan titik optimal di mana kuersetin paling efektif menyerap radiasi sinar tampak (visible) (Gambar 1).



Gambar 1. Kurva panjang gelombang maksimum kuersetin

Penentuan panjang gelombang maksimum dalam spektrofotometri UV-Vis sangat penting untuk memastikan sensitivitas dan akurasi pengukuran, terutama dalam analisis senyawa seperti kuersetin. Pengukuran pada panjang gelombang selain titik maksimum dapat mengurangi sensitivitas, sehingga hasil yang diperoleh mungkin kurang presisi. Pemilihan panjang gelombang maksimum ini penting dalam konteks spektrofotometri, karena pengukuran pada panjang gelombang dengan absorbansi maksimum akan menghasilkan data yang paling sensitif dan akurat. Hal ini memastikan bahwa metode yang digunakan dapat mendeteksi konsentrasi kuersetin dengan tingkat akurasi yang tinggi (Putri et al., 2023). Dengan demikian, nilai 432 nm menjadi acuan penting dalam proses analisis yang mengandalkan spektrofotometri untuk menentukan konsentrasi senyawa kuersetin (Gambar 1).

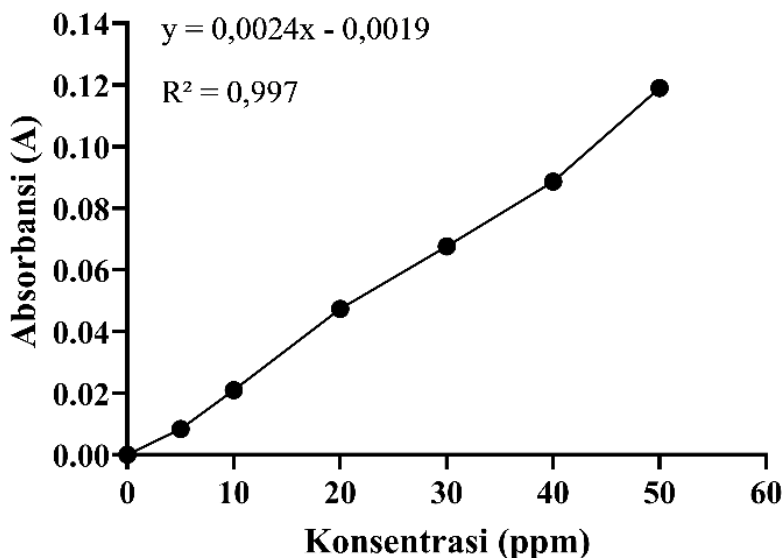
Pengujian Validasi Metode Analisis

Menurut *International Conference on Harmonization* (ICH) ada 10 parameter validasi, diantaranya presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantitas, spesifikasi, linearitas, kisaran (*range*), ketahanan, kekasaran dan kesesuaian. *United States Pharmacopeia* (USP) menyatakan bahwa tidak semuanya parameter untuk mengevaluasi validasi metode harus diuji, sehingga pengujian validasi dari metode analisis ekstrak sirih merah hanya 5 parameter yang diuji, yaitu linearitas, presisi, akurasi, batas deteksi dan batas kuantitas, karena kelima parameter tersebut telah mewakili data yang dibutuhkan untuk uji validasi.

Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan (dalam rentang tertentu) suatu penetapan kadar untuk memperoleh hasil uji yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam contoh. Konsentrasi dari sampel di

dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer yaitu hubungan linearitas antara absorbansi dengan konsentrasi larutan sampel. Linearitas ditentukan untuk memperoleh hasil pengujian absorbansi yang berbanding lurus dengan konsentrasi larutan standar. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (Fajri et al., 2024). Koefisien korelasi (R^2) adalah suatu ukuran hubungan linier antara dua set data (Anisah et al., 2021). Pengujian linearitas ditentukan dari parameter koefisien korelasi tersebut, dimana nilai koefisien korelasi untuk kurva standar $\geq 0,99$ menunjukkan bahwa garis yang dihitung dapat menjelaskan lebih dari 99% dari data eksperimen.



Gambar 2. Kurva kalibrasi kuersetin

Pengujian linearitas dalam validasi metode analisis kuersetin dilakukan dengan menggunakan enam konsentrasi standar yang berbeda, berkisar antara 5 ppm hingga 50 ppm. Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang maksimum 432 nm, yang telah ditentukan sebagai panjang gelombang optimal untuk kuersetin. Hasil pengujian linearitas ini dipresentasikan dalam bentuk persamaan regresi linier, yaitu $Y = 0,0024x - 0,0019$, di mana Y merupakan nilai serapan dan x merupakan konsentrasi kuersetin (Gambar 2). Koefisien korelasi (R^2) yang diperoleh dari kurva kalibrasi adalah 0,997 (Gambar 2), yang menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi kuersetin dan nilai serapannya sangat mendekati linier.

Nilai R^2 yang mendekati 1 ini menunjukkan bahwa metode pengukuran memiliki tingkat linearitas yang sangat baik, yang berarti bahwa perubahan dalam konsentrasi kuersetin akan secara proporsional tercermin dalam perubahan serapan. Ini penting dalam analisis kuantitatif, karena linearitas yang baik memastikan bahwa metode ini akurat dan dapat diandalkan dalam berbagai konsentrasi. Secara keseluruhan, hasil pengujian linearitas ini menegaskan bahwa metode spektrofotometri yang digunakan untuk mengukur kuersetin menunjukkan linearitas yang sangat baik, yang merupakan salah satu indikator penting dari validasi metode analisis (Chandra, 2023).

Presisi

Presisi (ketelitian) merupakan kedekatan antara hasil pengujian individu dalam serangkaian pengukuran terhadap suatu contoh homogen yang dilakukan pengambilan contoh secara berganda menurut prosedur yang telah ditetapkan. Awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter pertama yaitu keterulangan dan presisi antara. Presisi merupakan ukuran keterulangan metode

analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation*, RSD). Nilai RSD juga sering disebut dengan koefisien variasi atau KV dari sejumlah pengukuran sampel (Nugroho & Alrayan, 2024). Presisi pada hasil analisis menunjukkan kedekatan antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari beberapa pengambilan sampel yang homogen.

Tabel 2. Hasil pengujian presisi sampel ekstrak sirih merah

Ulangan	Absorban	a	b	mg QE/L (x)	mg QE/g	Rata-rata TFC	SD mg QE/g	%RSD
1	0,058	0,0024	-0,0019	24,819	24,819	24,303	0,645	2,65
2	0,055	0,0024	-0,0019	23,708	23,708			
3	0,056	0,0024	-0,0019	23,986	23,986			
4	0,056	0,0024	-0,0019	23,986	23,986			
5	0,058	0,0024	-0,0019	24,819	24,819			
6	0,055	0,0024	-0,0019	23,569	23,569			
7	0,059	0,0024	-0,0019	25,236	25,236			

Pengujian presisi yang dilakukan pada ekstrak sirih merah melibatkan pengulangan penimbangan sampel sebanyak tujuh kali untuk memastikan konsistensi hasil yang diperoleh. Dalam pengujian ini, alat yang digunakan adalah Spektrofotometer nano BMG LAB.TECH. Salah satu parameter yang dihitung dalam uji presisi adalah nilai % RSD (*Relative Standard Deviation*), yang menunjukkan tingkat keterulangan hasil dari serangkaian pengukuran. Berdasarkan hasil pengujian pada Tabel 2, nilai RSD yang diperoleh adalah 2,65%, yang masih berada di bawah ambang batas yang diizinkan, yaitu 6,5% untuk analit dengan konsentrasi rata-rata 24,30 ppm atau 24,30 mg QE/g. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode ini memiliki tingkat presisi yang memadai. Presisi yang baik mengindikasikan bahwa variasi antar pengukuran rendah dan hasilnya konsisten, sehingga metode ini dengan menggunakan alat spektrofotometer nano dapat diandalkan dalam pengujian flavonoid pada ekstrak sirih merah.

Akurasi

Akurasi (kecermatan) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali atau % recovery analit yang ditambahkan. Akurasi hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Untuk mencapai akurasi yang tinggi, hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur (Nurwanti et al., 2024). Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*).

Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Handoyo et al., 2022).

Pada penelitian ini akurasi ditentukan dengan metode penambahan larutan standar kuersetin yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam sampel. Akurasi dinyatakan dengan % *recovery* dari penambahan larutan standar yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam sampel. Pengujian akurasi

pada ekstrak sirih merah yang diadisi dengan kuersetin bertujuan untuk menilai sejauh mana metode pengujian dapat secara akurat mengukur konsentrasi flavonoid dalam sampel. Uji ini dilakukan dengan menggunakan tiga tingkat konsentrasi, yaitu 5 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm, dengan hasil yang dirangkum dalam bentuk persentase perolehan kembali (% *recovery*).

Tabel 3. Hasil pengujian akurasi ekstrak sirih merah adisi kuersetin

Konsentrasi						
Ekstrak sirih merah dan kuersetin (ppm)	Ekstrak sirih merah teori (ppm)	Kuersetin adisi teori (ppm)	Ekstrak sirih merah dan adisi kuersetin teori (ppm)	Terukur (ppm)	Recovery (%)	Rata-rata % Recovery
5	2,97	2,5	5,47	5,33	97,44	106,21
	2,97	2,5	5,47	6,05	110,60	
	2,97	2,5	5,47	6,05	110,60	
25	14,04	12,5	26,54	27,48	103,54	105,32
	14,04	12,5	26,54	28,19	106,21	
	14,04	12,5	26,54	28,19	106,21	
50	28,13	25	53,13	53,90	101,44	101,44
	28,13	25	53,13	53,19	100,11	
	28,13	25	53,13	54,61	102,78	

Hasil analisis parameter akurasi pada Tabel 3 menunjukkan konsentrasi 5 ppm memiliki nilai % recovery yang bervariasi antara 97,44% hingga 110,60%, dengan rata-rata recovery sebesar 104,0148%. Pada konsentrasi 25 ppm, nilai % recovery berkisar antara 103,54% hingga 106,22%, yang menunjukkan bahwa hasil pengukuran sangat mendekati konsentrasi teoritis (Tabel 3). Pada konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 50 ppm, nilai % recovery berada dalam rentang 100,11% hingga 102,79%, yang juga menunjukkan tingkat akurasi yang baik (Tabel 3). Rata-rata keseluruhan dari nilai % recovery pada ketiga konsentrasi seperti yang terdapat pada Tabel 3 adalah sebesar 104,33%, dimana nilai tersebut memenuhi syarat akurasi yang disyaratkan dalam pengujian, yaitu berada dalam rentang 80-110% (Yunita et al., 2020). Nilai-nilai ini mengindikasikan bahwa metode yang digunakan sangat akurat dan mampu mengukur kadar flavonoid dalam sampel ekstrak sirih merah dengan adisi kuersetin secara konsisten dan tepat.

Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantitasi (LoQ)

Batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ) merupakan suatu parameter yang digunakan untuk menggambarkan sensitivitas suatu metode analisis. Batas deteksi (*limit of detection*, LoD) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, akan tetapi tidak perlu ditentukan secara kuantitatif sehingga didapatkan nilai yang persis. LoD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit tersebut ada di atas atau di bawah nilai tertentu. Batas kuantitasi (*limit of quantitation*, LoQ) didefinisikan sebagai analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Nugroho & Alrayan, 2024).

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitas dihitung dengan menggunakan intersep dari kurva standar kuersetin (S) dan standar deviasi (SD). LoD dan LoQ dinyatakan dalam satuan ppm. Nilai LoD ditetapkan sebesar 4,06 ppm yang menunjukkan konsentrasi minimum kuersetin yang masih dapat

dideteksi oleh alat. Sementara itu, nilai LoQ sebesar 13,52 ppm menunjukkan konsentrasi minimum yang dapat diukur secara kuantitatif dengan tingkat akurasi yang dapat diterima. Berdasarkan Putri et al., (2020) yang melaporkan nilai LoD sebesar 5,12 ppm dan LoQ sebesar 15,53 ppm untuk analisis flavonoid total ekstrak tanaman herbal menggunakan spektrofotometri UV-Vis, maka metode yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan sensitivitas yang lebih baik. Selain itu, standar validasi seperti yang diterbitkan oleh AOAC (2016) maupun SNI 01-2891-1992 juga menyatakan bahwa nilai LoD dan LoQ yang baik harus disertai dengan parameter presisi dan akurasi yang memadai untuk memastikan keandalan hasil.

Secara keseluruhan, hasil pengujian ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan tidak hanya memenuhi standar akurasi dengan % *recovery* dalam rentang yang dapat diterima, tetapi juga memiliki sensitivitas yang baik melalui nilai LoD dan LoQ yang memadai. Hal ini menegaskan bahwa metode ini layak untuk digunakan dalam pengukuran konsentrasi flavonoid pada ekstrak sirih merah dengan akurasi yang tinggi dan konsisten (Nurhayati & Yuliana, 2022).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa metode pengukuran kadar total flavonoid dalam ekstrak etanol 70% daun sirih merah (*Piper crocatum* var. Ruiz & Pav) menggunakan spektrofotometer nano BMG LAB.TECH telah memenuhi kriteria validasi yang ditetapkan dalam pedoman ICH, mencakup parameter linearitas ($R^2 = 0,997$), presisi (%RSD = 2,65%), akurasi (rata-rata *recovery* = 104,33%), LoD (4,06 ppm), dan LoQ (13,52 ppm). Rata-rata kadar total flavonoid yang diperoleh adalah 24,30 mg QE/g. Dengan demikian, metode ini dinyatakan valid dan layak digunakan dalam kegiatan praktikum pendidikan serta penelitian ilmiah di laboratorium.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Sumber Daya Manusia IPB yang telah memberikan dana hibah penelitian jabatan fungsional PLP melalui kontrak nomor 16/HibahKom/IPB/2024. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Wakil Dekan SKP FMIPA IPB, Ketua Departemen Biokimia, Komisi Laboratorium Biokimia, serta dosen pendamping Dr. Popi Asri Kurniatin, S.Si., Apt., M.Si atas bimbingan selama proses penelitian. Penulis juga menghaturkan apresiasi kepada rekan-rekan di laboratorium dan staf administrasi Biokimia FMIPA IPB atas bantuan teknis dan administratif yang diberikan

DAFTAR PUSTAKA

- Agati, G., Brunetti, C., Fini, A., Gori, A., Guidi, L., Landi, M., Sebastiani, F., & Tattini, M. (2020). Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. *Antioxidants*, 9(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9111098>
- Anisah, S. U., Darmawati, A., & Prawita, A. (2021). Validation of UV Spectrophotometry Method for Determination of Lopinavir and Ritonavir Simultaneously. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 8(2), 48–54. <https://doi.org/10.20473/bikfar.v8i2.31760>
- AOAC International. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International* (20th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Badan Standardisasi Nasional. (1992). *SNI 01-2891-1992: Cara uji makanan dan minuman*. Jakarta: BSN.
- Chairunisa, F., Safithri, M., & Bintang, M. (2022). Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Red Betel Leaves (*Piper crocatum*) and Its Fractions against *Escherichia coli* pBR322 (Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Fraksinya terhadap *Escherichia coli* pBR322. *Curr. Biochem*, 9(1), 1–15.

- Chandra, M. A. (2023). Verifikasi Metode Analisis Larutan Quercetin Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (T60). *Borneo Journal of Pharmascientech*, 07(02), 59–64. <https://doi.org/10.51817/bjp.v7i1.484>
- Cong-Hau, N., Anh-Dao, L.-T., Nhon-Duc, L., & Thanh-Nho, N. (2021). Spectrophotometric Determination of Total Flavonoid Contents in Tea Products and Their Liquors Under Various Brewing Conditions. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 25, 740–750.
- Fajri, N., Prima, E. C., Riandi, R., & Sriyati, S. (2024). Validasi Metode Analisis Konsentrasi Larutan Kopi berdasarkan Spektroskopi Absorpsi Cahaya. *JIPFRI (Jurnal Inovasi Pendidikan Fisika Dan Riset Ilmiah)*, 8(1), 51–59. <https://doi.org/10.30599/jipfri.v8i1.2101>
- Handoyo, T. R., Purnomo, G. A., Maryanto, C. D., & Gani, M. R. (2022). Validasi dan Penetapan Kadar Senyawa Rutin pada Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan Metode KCKT. *Fitofarmaka: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.33751/jf.v12i1.3596>
- Kurniasari, R., Suzery, M., & Cahyono, B. (2024). Analysis of Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Cashew Leaf Extract (*Anacardium occidentale* L.) with Varying Ethanol Concentrations. *Jurnal Riset Kimia*, 15(2), 116–130. <https://doi.org/10.25077/jrk.v15i2.735>
- Nugroho, S. A., & Alrayan, R. (2024). Validasi Metode Analisa Piroksikam pada Sediaan Self Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Pharma Bhakta*, 4(1), 1–7.
- Nurhayati, S., & Yuliana, R. (2022). Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi Metode Spektrofotometri UV-Vis untuk Senyawa Fenolik dalam Ekstrak Daun. *Pharmacy: Jurnal Farmasi Indonesia*, 19(1), 78–85.
- Nurwanti, R., Hamzah, H., Yolandari, S., Ode, W., Ds, A., & Baubau, P. (2024). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Promotif Preventif*, 7(3), 642–650. <http://journal.unpacti.ac.id/index.php/JPP>
- Ramos, R., Bezerra, I., Ferreira, M., & Soares, L. (2017). Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of *Eugenia uniflora* Linn. *Pharmacognosy Research*, 9(3), 253–260. https://doi.org/10.4103/pr.pr_143_16
- Rustamsyah, A., Kartini, H., Martiani, I., & Sujana, D. (2023). Analisis Fenol dan Flavonoid Total Pada Beberapa Teh Putih (*Camellia sinensis* L.) yang Beredar di Pasaran. *Teknotan*, 16(3), 177–181. <https://doi.org/10.24198/jt.vol16n3.7>
- Putri, D. A., Nugroho, L. H., & Lestari, D. A. (2020). Validasi metode spektrofotometri untuk penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol tanaman herbal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 18(2), 89–95. <https://doi.org/10.35814/jifi.v18i2.1362>
- Putri, V. S., Ikhsan, A. N., Martien, R., & Adhyatmika. (2023). Validation of Uv-Vis Spectrophotometric Method to Determine Drug Release of Quercetin Loaded-Nanoemulsion. *Indonesian Journal of Pharmacy Indonesian J Pharm*, 34(2), 272–279.
- Wahyuningtyas, F., Arifin, I., & Anwar, K. (2025). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) Serta Penentuan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total. *Jurnal Ilmiah Sains*, 25(1), 1–12. <https://doi.org/10.35799/jis.v25i1>
- Yasa, I., Putra, N., & Wiadnyani, A. (2019). Pengaruh Konsentrasi Etanol Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) Menggunakan Metode Microwave Assisted Extraction (MAE). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 8(3), 278–284.
- Yunita, E., Yulianto, D., Fatimah, S., & Firanita, T. (2020). Validation of UV-Vis Spectrophotometric Method of Quercetin in Ethanol Extract of Tamarind Leaf. *Journal of Fundamental and Applied Pharmaceutical Science*, 1(1), 11–18. <https://doi.org/10.18196/jfaps.010102>