

Verifikasi Metode Analisis Larutan Quercetin Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (T60)

M. Andi Chandra*

^a Program Studi Pendidikan Profesi Apoteler, Fakultas Farmasi, Universitas Borneo Lestari, Banjarbaru, Indonesia

¹ andychandraa1@gmail.com

*korespondensi penulis

Kata kunci:

Kuersetin,
Verifikasi metode,
Spektrofotometer Uv-Vis

ABSTRAK

Quercetin memiliki banyak manfaat kesehatan antara lain: antidiabetes, antiobesitas, antioksidan, antivirus, antiinflamasi, antikanker. Penggunaan quercetin karena quercetin merupakan senyawa flavonoid yang banyak ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Validasi Metode juga merupakan persyaratan peraturan utama dalam analisis farmasi dengan kepatuhan sesuai pedoman atau bab farmakope apa pun dengan cakupan yang sama. Verifikasi metode analisis bertujuan untuk memastikan bahwa analis dapat menerapkan metode analisis dengan baik dan menjamin kualitas hasil pengujian. Verifikasi metode analisis kuersetin dalam buffer fosfat pH 7,4 menggunakan spektrofotometer UV-vis (T60) dapat disimpulkan bahwa parameter linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), akurasi dan presisi telah memenuhi persyaratan dengan hasil berurutan berikut ini. ; 0,9995;1,427;4,326;102;0,273. Hasil verifikasi metode analisis ini diharapkan dapat diterapkan dalam metode analisis dengan baik dan menjamin kualitas hasil pengujian.

Key word:

Quercetin,
Verification method,
UV-VIS Spectrophotometer

ABSTRACT

Quercetin has many health benefits including: antidiabetic, antiobesity, antioxidant, antiviral, anti-inflammatory, anticancer. The use of quercetin is due to quercetin is a flavonoid compound that is found in almost higher plants, and has strong antioxidant activity. Method Validation is also the main regulatory requirement in pharmaceutical analysis with compliance as per the guidelines or chapter any pharmacopeia of the same scope. Verification of analytical methods aims to ensure that analysts can apply analytical methods properly and guarantee the quality of test results. Verification of the analytical method of quercetin in phosphate buffer pH 7.4 using a UV-vis spectrophotometer (T60) it can be concluded that the linearity parameters, detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), accuracy and precision have met the requirements with the following sequential results. ; 0.9995;1.427;4.326;102;0.273. The results of the verification of this analytical method are expected to be applied in the analytical method properly and ensure the quality of the test results.

Pendahuluan

Quercetin memiliki banyak manfaat kesehatan antara lain: antidiabetes, antiobesitas, antioksidan, antivirus, antiinflamasi, antikanker. Proses ekstraksi quercetin dilakukan dengan hidrolisis asam, karena quercetin tidak hanya terdapat dalam bentuk bebas, tetapi juga dalam bentuk terikat sebagai glikosida yaitu isoquercitrin (Sulistyowati dkk., 2021). Quercetin dan kaemferol merupakan senyawa

flavonoid yang termasuk dalam kelompok flavonol yang dapat berperan dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh, yaitu dengan meningkatkan aktivitas interleukin-2 dan proliferasi limfosit (Rauf et al., 2016). Flavonoid melalui mekanismenya juga dapat digunakan untuk pengobatan arterosklerosis, antiinflamasi, antitumor, antitrombogenik, antivirus, dan antiosteoporosis (Simanjuntak, 2012).

Penggunaan quercetin karena quercetin merupakan senyawa flavonoid yang banyak ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Quercetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang terdiri dari gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C5 (Desmiaty et al., 2009). Validasi Metode adalah atribut kualitas penting untuk evaluasi bahan obat apa pun melalui metode yang ditetapkan di laboratorium kendali mutu. Validasi Metode juga merupakan persyaratan peraturan utama dalam analisis farmasi dengan kepatuhan sesuai pedoman atau bab farmakope mana pun dengan cakupan yang sama (Malviya et al., 2021).

Validasi dianggap sebagai aktivitas praktik manufaktur yang baik (GMP); eksperimen validasi harus didokumentasikan dengan baik dan dilakukan pada instrumentasi dan peralatan yang memenuhi syarat dan terkalibrasi. Pada tahap ini, harus ada bukti terdokumentasi bahwa metode tersebut kuat. USP telah menerbitkan pedoman khusus untuk validasi metode untuk evaluasi gabungan. USP mendefinisikan delapan langkah validasi yaitu Akurasi, Presisi, Spesifisitas, Batas Deteksi, Batas Kuantitas, Linearitas dan Jangkauan (Malviya et al., 2021).

Berdasarkan uraian di atas, maka akan dilakukan penelitian terkait verifikasi metode spektroskopi uv vis, dengan menggunakan larutan standar quercetin. Verifikasi metode analisis bertujuan untuk memastikan bahwa analisis dapat menerapkan metode analisis dengan baik dan menjamin kualitas hasil pengujian. Verifikasi metode diperlukan apabila terdapat perubahan pada instrumen yang digunakan pada analisis sebelumnya atau metode tersebut sudah lama digunakan. Verifikasi metode ini diharapkan dapat dijadikan standar penggunaan spektroskopi uv vis di laboratorium.

Metode

Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan melakukan analisis larutan kuersetin menggunakan spektrofotometer Uv-Vis

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Universitas Borneo Lestari

Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah rangkaian analisis kuersetin menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dan Sampel yang digunakan adalah Kuersetin

Instrumen Penelitian

Instrumen pada penelitian ini menggunakan spektrofotometer Uv-Vis (T60)

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometri UV-Vis (T60), kuvet, labu takar 10 ml, neraca analitik, kertas roti, mikropipet, kuersetin, etanol 96%, pelarut buffer fosfat pH 7,4.

Preparasi Larutan Induk

Quercetin ditimbang hati-hati dengan neraca analitik seberat 10,0 mg lalu dilarutkan dengan larutan buffer fosfat pH 7,4 dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen. Dari larutan ini diambil kembali 1,0 ml secara hati-hati dan diencerkan dengan 10 ml buffer fosfat pH 7,4. Larutan standar induk diperoleh dengan konsentrasi 100 ppm. (Bakti et al., 2017).

Penentuan Panjang Gelombang

Ambil larutan dengan konsentrasi 100 ppm, serapannya diukur pada rentang panjang gelombang 200-400 nm (Cordenonsi et al., 2017). Panjang gelombang yang menunjukkan tinggi nilai serapan merupakan panjang gelombang maksimum. (Bakti et al., 2017).

Penentuan Operatingtime

Penentuan waktu operasi dibaca menggunakan panjang gelombang maksimum yang diperoleh dengan interval 5 menit dimulai dari 0 menit hingga 60 menit untuk mendapatkan nilai serapan yang stabil (Bakti et al., 2017).

Penentuan Kurva Baku

Rangkaian kurva standar diambil dari larutan induk yang akan diencerkan menjadi rangkaian kurva standar 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm (Jha et al., 2020), dibiarkan sesuai dengan hasil waktu pengoperasian. Pembacaan dilakukan deret kadar serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan dibuat persamaan regresi linier (Bakti et al., 2017).

Verifikasi metode analisis

Linearitas

Larutan induk kuersetin 1000 ppm diambil sebanyak jumlah yang diperlukan sehingga diperoleh konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm dalam 10 mL. Masing-masing larutan deret konsentrasi diambil 1 mL dan dilakukan pembacaan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 375 nm. Hasil penyerapan yang diperoleh kemudian dianalisis dengan persamaan regresi linier dan diperoleh R (koefisien relasional). Nilai linearitas dikatakan baik jika nilai r 0,995 atau 1. Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) persamaan regresi $y = bx + a$ (Riadi, 2016).

Akurasi

Larutan dengan konsentrasi 40 ppm dibuat dan dihitung sehingga diperoleh konsentrasi awal setara dengan 80, 100 dan 120%. Konsentrasi yang dilakukan diulang sebanyak 3 kali. Setiap konsentrasi dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 375 nm. Dilakukan perhitungan persen pemulihan. Persen pemulihan (% recovery) dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Harmita, 2004):

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar yang diperoleh}}{\text{Kadar yang sebenarnya}} \times 100 \%$$

Presisi

Larutan dengan konsentrasi 40 ppm dibuat dengan pengulangan sebanyak 6 kali. Konsentrasi yang dibuat dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 375 nm. Presisi pengujian ditentukan oleh parameter deviasi standar

relatif (RSD) dengan rumus sebagai berikut (Sudewi & Pontoh, 2018):

$$RSD = \frac{SD}{x} \times 100 \%$$

^{RSD} Relative Standar Deviation; ^{SD} Standard Deviation;

^x The average level of quercetin

LOD dan LOQ

Larutan seri dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm dalam 10 mL. Ambil 1 mL setiap rangkaian kadar larutan dan baca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 375 nm. Untuk menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) digunakan rumus (Sugihartini et al., 2014):

$$LOD = \frac{3,3Sy/x}{b} \quad LOQ = \frac{10Sy/x}{b}$$

Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini dengan melihat hasil masing-masing parameter uji yang meliputi Uji Linearitas, Akurasi, LOD dan LOQ.

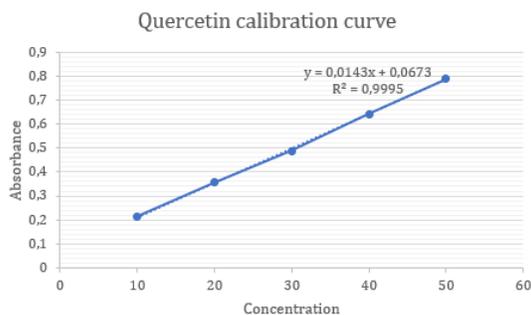
Hasil dan Pembahasan

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui serapan berapa banyak zat yang terbaca pada spektrofotometri UV-Vis optimum. Panjang gelombang kuersetin dipindai dengan larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 g/mL dalam larutan buffer fosfat pH 7,4. Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan pada pelarut buffer fosfat pH 7,4 adalah 375 nm dengan serapan 0,685.

Kurva Kalibrasi dan Metode Verifikasi

Hasil penentuan panjang gelombang maksimum selanjutnya dilakukan pengukuran dan perhitungan kurva kalibrasi, datanya terdapat pada Lampiran 16. Berdasarkan data tersebut diperoleh persamaan kurva kalibrasi antara pelarut kuersetin dan buffer fosfat pH 7,4 ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik kurva kalibrasi kuersetin dalam buffer fosfat pH 7,4

Verifikasi Metode Analisis

Verifikasi metode analisis bertujuan untuk memastikan data kuantitatif akurat dan dapat direproduksi. Verifikasi parameter dengan metode analisis yang dilakukan yaitu penentuan linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), akurasi dan presisi. Verifikasi metode analisis Quercetin dilakukan dengan buffer fosfat pH 7,4 sebagai parameter uji penetrasi obat. Hasil verifikasi metode analisis kuersetin dengan pelarut buffer fosfat dapat dilihat pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Verifikasi parameter metode analisis pelarut buffer fosfat kuersetin pH 7,4

Parameter	Results	Requirements
Linearitas	0,9995	$r > 0,99$
Limit Deteksi (LOD)	1,427	$< 2,0 \%$
Limit Kuantifikasi (LOQ)	4,326	$V \times 0 < 2\%$
Akurasi	102	98-102%.
Presisi	0,273	$< 2\%$

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis yang memberikan penyerapan secara langsung baik, sebanding dengan konsentrasi analit dan sampel (Wahyuni et al., 2019). Dari penelitian tersebut, hasil linearitas dapat dihitung dengan parameter koefisien korelasi pada persamaan linear $y = bx + a$. Hasil linearitas.

Pada penelitian ini diperoleh kurva baku yaitu $y = 0,0143x + 0,0673$ dengan nilai r sebesar 0,9995. Berdasarkan persamaan linier kriteria penerimaan koefisien korelasi (r) adalah $r > 0,99$ yang menunjukkan linearitas sangat baik (Yus & Marlinda, 2018). Hasil penelitian dengan literatur menunjukkan hasil korelasi yang berbanding lurus dengan konsentrasi dan

serapan yang dihasilkan, artinya hasil kurva antara serapan dan konsentrasi adalah linier, jika terjadi peningkatan nilai konsentrasi maka semakin besar pula nilai konsentrasinya. nilai serapannya juga meningkat.

Berdasarkan Tabel 1 nilai LOD sebesar 1,427% menunjukkan bahwa metode ini mampu mendeteksi kadar dalam analit sebesar 1,427%. Jika kadar quercetin pada sampel kurang dari atau dibawah 1,427% maka metode ini tidak dapat mendeteksi sampel, nilai LOD termasuk dalam persyaratan dengan nilai $< 2\%$ (ICH, 2015 dalam Shrivastava & Gupta, 2015). Nilai LOQ yang diperoleh sebesar 4,326%, hal ini menunjukkan bahwa nilai analit masih dapat dikuantifikasi dengan presisi berada diatas 4,326% Nilai LOQ dikatakan baik karena nilai konsentrasi sampel yang diuji berada diatas nilai LOQ, sehingga akurasi dan presisinya dapat diterima.

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan analit sebenarnya. Akurasi menyatakan persen keuntungan kembali atau (% recovery) (Irnawati et al., 2016). Berdasarkan data pada Tabel 16 hasil nilai rata-rata % recovery adalah 102%. Nilai tersebut memenuhi syarat dimana menurut Harmita (2004) nilai rentang % recovery adalah antara 98-102%.

Presisi dibuat menggunakan enam kali replikasi dengan pembuatan larutan kemudian diukur pada panjang gelombang 375 nm. Data presisi inilah yang digunakan untuk menentukan nilai akurasi. Menurut (Arikalang et al., 2018) menyebutkan nilai deviasi standar relatif (% RSD) $< 2\%$ menunjukkan bahwa parameter presisi memberikan keterulangan yang dapat diterima dan dinyatakan dengan baik sehingga sistem operasional alat dan analisis cukup baik. metode. Berdasarkan data pada Tabel 15, hasil penelitian nilai presisi yang diperoleh dari simpangan baku relatif yang dihitung adalah 0,273%, memenuhi syarat nilai presisi yang baik dari segi akurasi dengan %RSD di bawah 2%.

Simpulan

Verifikasi metode analisis kuersetin dalam buffer fosfat pH 7,4 menggunakan spektrofotometer UV-vis (T60) dapat

disimpulkan bahwa parameter linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), akurasi dan presisi telah memenuhi persyaratan dengan hasil berurutan berikut ini ; 0,9995; 1,427; 4,326; 102; 0,273. Hasil verifikasi metode analisis ini diharapkan dapat diterapkan dalam metode analisis dengan baik dan menjamin kualitas hasil pengujian.

Ucapan Terima Kasih (*optional*)

Terimakasih penulis ucapkan kepada Universitas Borneo Lestari dan Laboratorium Kimia yang telah menjadi tempat penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Arikalang, T. G., Sri S., Johnly, & A. Rorong. 2018. Optimasi dan Validasi Metode Analisis dalam Penentuan Kandungan Total Fenolik pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (*Abelmoschus manihot* L.) yang Diukur dengan Spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 3 (7): 14-21.
- Bakti, A. A., L. Triyasmono, & M. I. Rizki. 2017. Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Uji Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.) dengan Metode DPPH. *Jurnal Pharmascience*. 4(1): 102 – 108.
- Cordenonsia. Rafaela M. Sponchiadoa, S. C. Campanharoa, C. V. Garciaa, Renata P. Raffinb & Elfrides E. S. Schapoval. 2017. Study of Flavonoids presente in Pomelo (*Citrus maxima*) by DSC, UV-VIS, IR, 1H AND 13C NMR AND MS. *Drug Analytical Research*. 1 (2): 31-37.
- Desmiaty, Y., J. Ratnawati, & P. Andini. 2009. Penentuan Jumlah Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) Secara Kolorimetri Komplementer. Dipresentasikan Pada Seminar Nasional POKJANAS TOI XXXVI 13 & 14 Mei 2009, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1 (3): 117-135.
- Irnawati, Muhammad H. S. & Wa O. N. Dewi. 2016. Analisis hidrokuinon pada krim pemutih wajah dengan metode spektrofotometri uv-vis. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5 (3): 229-237.
- Malviya K, Monika M, Rajesh J. C, Rajesh P. C. 2021. Method Validation Of Compendial And Non Compendial Uv-Visible Spectroscopic Method For Drug Substances As Per Usp And Ich Guidelines. *International Journal of Pharmaceutical Erudition*. 11 (2) : 92-98.
- Rauf, A., Haeria, & Anas, D. D. (2016). Efek Immunostimulan Fraksi Daun Katuk (*Sauropus androgynus* L. MERR) Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag pada Mencit Jantan (*Mus Muculus*). *Jurnal Farmasi UIN Alauddin Makassar*, 4(4), 9–15.
- Riadi, E. (2016). *Statistika Penelitian (Analisis Manual dan IBM SPSS)*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Shrivastava, A. & Gupta V.B. 2015. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientist*. 2 (1): 21 – 25. DOI: 10.4103/2229-5186.79345.
- Simanjuntak, K. (2012). Peran Antioksidan Flavonoid dalam Meningkatkan Kesehatan. *Bina Widya*, 23(3), 135–140.

<https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.1988.tb00228.x>

- Sudewi S, Pontoh J. 2018. Optimasi dan Validasi Metode Analisis dalam Penentuan Kandungan Total Flavonoid pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (*Abelmoscus Manihot L.*) yang Diukur Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Pharmacon*. 7(3):32–41.
- Sugihartini, N., & Lena, M. 2015. Formula Gel Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dengan Variasi Gelling Agent Sebagai Sediaan Luka Bakar. *Pharmaciana*, 5(1), 43-52.
- Sulistiyowati E, Bekti N, Yuni R. 2021. Verifikasi Metode Analisis Kuersetin Fraksi Etil Asetat Daun Kenikir (*Cosmos caudatus H.B.K*) Secara Klt-Densitometri. *Jurnal Ilmiah Farmas*. 10 (2) : 7-12.
- Wahyuni S, Siti M, Aminah. 2019. Validasi Metode Analisis Cemaran DNA Babi pada Bakso Sapi Menggunakan Primer Mitokondria D-Loop22 dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Galenika Journal of Pharmacy*. 5 (1) : 65-72.
- Yus N. M. & Marlinda. 2018. Penetapan kadar residu formalin pada ikan tongkol yang diberi jeruk nipis (Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis). *JOPS*. 2(4): 22-28.