

Verifikasi Metode Penetapan Kadar Fenol Total Cara Folin-Ciocalteu

Method Verification for Total Phenolic Content Determination via Folin-Ciocalteu Assay

Dewi Primayanti Laela^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin

* dewiprimayanti@gmail.com

ABSTRAK

Laboratorium Biofarmaka tengah mempersiapkan akreditasi ISO/IEC 17025, yang mewajibkan penggunaan metode analisis yang tervalidasi dan terverifikasi untuk metode standar. Penelitian ini bertujuan mendukung proses verifikasi metode penetapan fenol total menggunakan reagen Folin–Ciocalteu, sebagaimana tercantum dalam Farmakope Herbal Indonesia Edisi I tahun 2013. Proses verifikasi dilakukan dengan menguji parameter linearitas, presisi, akurasi, limit deteksi (LoD), dan limit kuantifikasi (LoQ). Seluruh parameter menunjukkan hasil yang sesuai dengan standar keberterimaan menurut pedoman ICH Q2(R1) dan ISO/IEC 17025:2017, dengan nilai koefisien determinasi (r^2) sebesar 0,9993, presisi (%RSD) 1,67%, dan akurasi (% recovery) sebesar 101,40%. Nilai LoD dan LoQ masing-masing sebesar 7,06 ppm dan 21,40 ppm, yang mencerminkan kemampuan metode dalam mendeteksi dan mengukur fenol total dalam kadar rendah. Walaupun pengujian dilakukan pada ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*), metode ini bersifat umum dan dapat diterapkan pada berbagai ekstrak tanaman lainnya. Berdasarkan hasil tersebut, metode ini layak diterapkan dalam kegiatan rutin laboratorium dan dapat diandalkan dalam mendukung sistem mutu berbasis ISO/IEC 17025.

Kata kunci — Verifikasi metode, kadar fenol total, ekstrak, ISO/IEC 17025.

ABSTRACT

The Biofarmaka Laboratory is currently preparing for ISO/IEC 17025 accreditation, which requires the use of validated analytical methods and verified procedures for standard methods. This study aims to support the verification of a method for determining total phenolic content using the Folin–Ciocalteu reagent, as outlined in the Indonesian Herbal Pharmacopoeia, First Edition (2013). Verification was conducted by evaluating linearity, precision, accuracy, limit of detection (LoD), and limit of quantification (LoQ). All parameters met the acceptance criteria based on ICH Q2(R1) and ISO/IEC 17025:2017 guidelines, with a determination coefficient (r^2) of 0.9993, precision (%RSD) of 1.67%, and accuracy (% recovery) of 101.40%. The LoD and LoQ values were 7.06 ppm and 21.40 ppm, respectively, indicating the method's sensitivity in detecting and quantifying low concentrations of total phenolics. Although the analysis was conducted on green tea extract (*Camellia sinensis*), the method is generally applicable to various other plant extracts. These results demonstrate that the method is suitable for routine laboratory use and reliable for implementation in support of ISO/IEC 17025-based quality systems.

Keywords — Method verification, total phenol content, extract, ISO/IEC 17025.

1. Pendahuluan

Laboratorium Biofarmaka merupakan fasilitas pengujian yang berperan dalam mendukung kegiatan akademik dan pelayanan kepada masyarakat, khususnya dalam rangka memenuhi persyaratan akreditasi ISO/IEC 17025:2017. Dalam standar tersebut, laboratorium pengujian diwajibkan menggunakan metode yang telah tervalidasi atau

memverifikasi metode standar sebelum digunakan secara rutin. Seluruh proses pengujian juga harus dilakukan menggunakan peralatan yang telah terkalibrasi, serta bahan yang memiliki tingkat kemurnian memadai dan bahan acuan bersertifikat (Certified Reference Materials/CRM) guna menjamin ketepatan, keakuratan, dan keandalan hasil uji.

OPEN ACCESS

© 2025. Dewi Primayanti Laela



Creative Commons
Attribution 4.0 International License

Salah satu bentuk implementasi dari persyaratan tersebut adalah verifikasi metode penetapan kadar fenol total, berdasarkan prosedur yang tercantum dalam Farmakope Herbal Indonesia (FHI) Edisi I tahun 2013. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) sebagai model uji, mengingat tanaman ini dikenal memiliki kandungan fenol yang tinggi dan mewakili karakteristik umum ekstrak herbal. Verifikasi ini sangat penting untuk memastikan bahwa metode dapat diterapkan secara andal dan menghasilkan data yang valid dalam kondisi laboratorium pengujian, sekaligus mendukung Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) dalam menyusun dokumen teknis verifikasi metode yang dapat dijadikan acuan bagi ekstrak tanaman lainnya dengan penyesuaian yang sesuai.

Verifikasi metode analisis merupakan proses sistematis untuk mengevaluasi parameter-parameter tertentu melalui pengujian laboratorium, dengan tujuan memastikan metode memenuhi kriteria kelayakan dan kesesuaian untuk digunakan (Harmita, 2004). Langkah ini penting untuk menjamin bahwa metode bersifat reliabel, akurat, presisi, serta mampu menghasilkan data yang konsisten dan dapat dipertanggungjawabkan (ICH Q2(R1), 2005; AOAC, 2016). ISO/IEC 17025:2017. Verifikasi harus dilakukan terhadap metode standar sebelum diterapkan secara rutin. Dalam penelitian ini, dilakukan verifikasi metode penetapan kadar fenol total pada ekstrak teh hijau menggunakan spektrofotometer UV-Vis, berdasarkan metode FHI Edisi I tahun 2013. Parameter verifikasi yang dianalisis meliputi presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi (LoD), dan batas kuantifikasi (LoQ), sesuai dengan karakteristik metode dan tujuan pengujian (ICH Q2(R1), 2005; ISO/IEC 17025:2017).

Penetapan kadar fenol total menjadi langkah penting dalam evaluasi potensi aktivitas biologis tanaman, terutama sebagai antioksidan. Polifenol adalah metabolit sekunder yang berfungsi sebagai penangkal radikal bebas. Spektrofotometri UV-Vis menjadi metode yang sering digunakan karena bersifat praktis, sensitif, dan dapat diterapkan pada berbagai jenis ekstrak. Penetapan kadar fenol total umumnya dilakukan menggunakan reagen Folin–Ciocalteu dan dibaca pada panjang gelombang sekitar 725 nm,

dengan hasil dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat (GAE) (Singleton et al., 1999; Pourmorad et al., 2006).

Ekstrak merupakan hasil pemisahan senyawa aktif dari bahan alam menggunakan pelarut tertentu, dengan tujuan memperoleh komponen yang memiliki aktivitas biologis atau farmakologis. Senyawa seperti polifenol dan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan banyak terkandung dalam ekstrak tanaman, sehingga penting untuk dianalisis kandungannya secara tepat dan valid (Handa et al., 2008; Azwanida, 2015).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dirancang apakah metode penetapan kadar fenol total berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (FHI) Edisi I tahun 2013 dapat diterapkan pada ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) di Laboratorium Biofarmaka, serta apakah metode tersebut memenuhi kriteria presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi (LoD), dan batas kuantifikasi (LoQ) sesuai dengan standar ISO/IEC 17025:2017 dan ICH Q2(R1). Penelitian ini bertujuan untuk memverifikasi metode tersebut dengan menilai parameter-parameter utama guna memastikan keandalan dan validitas data yang dihasilkan, sehingga dapat dijadikan dasar penerapan pada ekstrak herbal lainnya. Adapun manfaat dari penelitian ini adalah memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan metode analisis senyawa bioaktif, mendukung peningkatan mutu serta akreditasi laboratorium pengujian, dan menjadi acuan bagi Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) dalam menyusun dokumen teknis verifikasi metode. Tahapan penelitian dilakukan secara sistematis, dimulai dari proses ekstraksi teh hijau, persiapan larutan standar gallic acid, analisis dengan spektrofotometer UV-Vis, penentuan kurva kalibrasi untuk mengevaluasi linearitas, uji presisi (repeatability dan intermediate precision), uji akurasi (melalui recovery), perhitungan LoD dan LoQ, hingga evaluasi kesesuaian metode secara keseluruhan, sehingga seluruh rangkaian tersebut saling mendukung dalam menghasilkan metode yang valid.

2. Metodologi

Penelitian ini dilaksanakan selama kurang lebih satu bulan pada Mei 2024, bertempat di



Laboratorium Biofarmaka, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Kegiatan yang dilakukan meliputi tahapan kalibrasi instrumen, proses ekstraksi, penyiapan reagen, pembuatan larutan standar, serta pengujian terhadap larutan standar dan sampel ekstrak. Analisis dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1800, yang telah dikalibrasi dan memenuhi standar operasional laboratorium. Instrumen ini bekerja pada rentang panjang gelombang 190–1100 nm dengan resolusi 1 nm, dan menggunakan sel kuarsa 1 cm sebagai wadah sampel. Kondisi optimal selama pengukuran ditetapkan pada panjang gelombang 725 nm, sesuai dengan karakteristik reaksi antara senyawa fenolik dan reagen Folin–Ciocalteu.

2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi berbagai peralatan gelas laboratorium, mikropipet dengan volume 10–100 μ L (Thermo), 100–1000 μ L dan 1000–5000 μ L (Eppendorf), neraca analitik OHAUS PX224/E, rotary evaporator merek IKA, hot plate stirrer merek IKA, alat penyaring vakum, erlenmeyer vakum, serta corong Buchner. Instrumen utama untuk analisis kuantitatif yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1800 yang telah terkalibrasi.

2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari simplisia teh hijau Kepala Djenggot (*Camellia sinensis*), metanol pro analisis (MERCK), etanol 96% teknis, akuades, kertas saring Whatman No. 1 (MERCK), asam galat (SIGMA-Aldrich), reagen Folin–Ciocalteu (MERCK), dan larutan natrium hidroksida (NaOH) dari MERCK.

2.3 Tahapan Pengujian

2.3.1 Penyiapan sampel uji (ekstrak teh hijau)

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini berupa ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*). Simplisia daun teh hijau ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1:10 (b/v). Proses maserasi dilakukan selama 48 jam pada suhu ruang, dengan pengadukan ringan setiap hari. Setelah selesai,

campuran disaring menggunakan kertas saring, dan filtrat diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang dihasilkan disimpan dalam wadah gelap dan digunakan sebagai matriks dalam uji verifikasi metode analisis kadar fenol total.

2.3.2 Pembuatan kurva kalibrasi

Pembuatan larutan Folin-ciocalteu 7,5%, dipipet 7,5 mL Folin-Ciocalteu, dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, dan dicukupkan dengan aquades bebas CO₂ hingga mencapai tanda batas, kemudian dihomogenkan.

2.3.3 Pembuatan larutan NaOH 1%

Ditimbang 1 g NaOH dimasukan ke dalam labu tentukur 100 mL dan dicukupkan dengan aquades bebas CO₂ hingga mencapai tanda batas dan dihomogenkan.

2.3.4 Pembuatan larutan pembanding

Ditimbang seksama 10 mg pembanding asam galat dimasukan ke dalam labu takar 25 mL, ditambahkan dengan metanol P hingga mencapai tanda batas. Pengenceran dilakukan secara kuantitatif yaitu 5, 15, 30, 50, 70 dan 100 μ g/L dan dihomogenkan.

2.3.5 Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Sebanyak 1 mL larutan asam galat 70 μ g/mL dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL Folin-ciocalteu konsentrasi 7,5%, Larutan diinkubasi selama 8 menit. Setelah itu, ditambahkan 4 mL NaOH 1% dan diinkubasi selama 1 jam. Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 730 nm. Absorbansi tertinggi menunjukkan puncak spektrum, dan panjang gelombang yang memberikan serapan tertinggi digunakan sebagai panjang gelombang serapan maksimum.

2.3.6 Pengukuran larutan pembanding

Sebanyak 1 mL dari setiap larutan pembanding dipipet dan dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL Folin-ciocalteu 7,5% dan didiamkan selama 8 menit. Setelah itu, ditambahkan 4 mL NaOH 1% dan diinkubasi selama 1 jam. Serapan masing-masing



konsentrasi diukur pada panjang gelombang maksimum, dan kemudian dibuat kurva kalibrasi pengukuran.

2.4 Pengukuran kadar fenol total sampel uji

2.4.1 Pembuatan larutan uji

Sebanyak 0.2 g ekstrak ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam lerlenmeyer ditambahkan 25 mL metanol P, aduk selama 30 menit dengan pengaduk magnetik, saring ke dalam labu tentukur 25 mL, larutkan dengan metanol P hingga tanda batas.

2.4.2 Pengukuran kadar fenol total sampel uji

Dibuat pengenceran larutan uji sampel 100 µg/mL, dipipet 1 mL dari larutan tersebut, selanjutnya, ditambahkan 5 mL Folin-ciocalteu 7,5%, didiamkan selama 8 menit. Setelah itu, ditambahkan 4 mL NaOH 1% dan diinkubasi selama 1 jam. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum, dan pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

2.5 Pengujian beberapa parameter verifikasi metode

2.5.1 Uji presisi

Presisi merupakan salah satu parameter penting dalam verifikasi metode analisis, yang menggambarkan konsistensi hasil pengukuran berulang dalam kondisi yang sama. Presisi dapat dikategorikan menjadi repeatability (presisi jangka pendek) dan intermediate precision (presisi antar waktu, analisis, atau alat yang berbeda). Evaluasi presisi dilakukan melalui pengukuran berulang, kemudian dihitung nilai simpangan baku (standard deviation/SD) dan koefisien variasi atau relative standard deviation (%RSD) sebagai indikator kestabilan hasil (ICH Q2(R1), 2005; ISO/IEC 17025:2017; Harmita, 2004).

Rumus simpangan baku (SD):

$$sd = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Keterangan : SD menunjukkan simpangan baku (standar deviasi), x_i menyatakan hasil pengujian ke-i, $\bar{x}$ merupakan rerata dari seluruh hasil pengujian, dan n menunjukkan jumlah total data pengujian.

Rumus %RSD:

$$\%RSD = \frac{sd}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan: RSD menunjukkan standar deviasi relatif, SD adalah standar deviasi dan $\bar{x}$ adalah rerata hasil pengulangan pengujian

Presisi yang baik pada suatu metode analisis tercermin dari nilai persen koefisien variasi (%RSD) yang rendah, karena menunjukkan tingkat keterulangan hasil pengukuran dalam kondisi uji yang seragam. Untuk metode kuantitatif, kisaran % RSD yang dapat diterima umumnya berada antara 2–5%, tergantung pada jenis sampel dan kompleksitas matriks. Nilai % RSD yang kecil menandakan bahwa metode tersebut memiliki kestabilan dan konsistensi yang memadai. Namun demikian, presisi yang tinggi tidak selalu menjamin akurasi hasil, karena masih dimungkinkan adanya pengaruh galat sistematis yang tidak terdeteksi. Oleh karena itu, penilaian presisi harus dilakukan bersamaan dengan parameter verifikasi lainnya. Sesuai dengan pedoman ICH Q2(R1) dan prinsip sistem mutu laboratorium pada ISO/IEC 17025:2017, nilai presisi dianggap memenuhi kriteria apabila nilai % RSD tidak melebihi batas yang ditetapkan secara ilmiah berdasarkan konteks pengujian dan tujuan penggunaan (ICH, 2005; ISO, 2017; Hadi & Asiah, 2020; Yuwono & Indrayanto, 2005).

2.5.2 Uji akurasi

Akurasi adalah kemampuan suatu metode analisis untuk menghasilkan hasil pengukuran yang mendekati nilai analit sebenarnya. Dalam verifikasi metode, akurasi berfungsi untuk menunjukkan sejauh mana metode dapat memberikan hasil yang benar dan bebas dari bias sistematis. Evaluasi akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali (recovery), yaitu dengan menambahkan larutan standar (spiking) ke dalam sampel, kemudian dianalisis menggunakan metode yang akan diverifikasi. Nilai recovery dinyatakan dalam bentuk persentase, yang dihitung sebagai perbandingan antara konsentrasi analit yang terukur dengan konsentrasi analit yang sebenarnya ditambahkan ke dalam sampel.

$$\% \text{ Recover} = \frac{(C \text{ terukur} - C \text{ sampel/sebelum spike})}{C \text{ asam galat teori}} \times 100\%$$



Menurut standar ISO/IEC 17025:2017 dan ICH Q2(R1), metode dikatakan akurat apabila nilai recovery berada dalam rentang 80–120%, tergantung pada jenis analit, matriks, dan tujuan pengujian. Pedoman SANTE/11312/2021 menyarankan batas yang lebih luas, yaitu antara 70–120%. Nilai recovery yang terlalu rendah atau tinggi dapat menandakan adanya bias atau gangguan matriks, sehingga metode perlu dievaluasi ulang (ICH Q2(R1), 2005; ISO/IEC 17025:2017; SANTE/11312/2021; Gandjar & Rohman, 2012; Yuwono & Indrayanto, 2005).

2.5.3 Uji linieritas

Linieritas adalah parameter dalam verifikasi metode analisis yang menggambarkan sejauh mana respon instrumen berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam rentang tertentu. Uji linieritas dilakukan dengan menganalisis larutan standar pada beberapa tingkat konsentrasi, kemudian plot hubungan antara konsentrasi (x) dan respon instrumen (y) untuk membentuk kurva kalibrasi. Hubungan linier ini dinyatakan dalam bentuk persamaan regresi linier sederhana:

$$y = a + bx$$

Dalam persamaan regresi, y adalah respons instrumen, x konsentrasi analit, a intersep (titik potong sumbu y), dan b slope (kemiringan garis). Tingkat linier ditentukan dari nilai koefisien determinasi (r^2), di mana nilai $r^2 \geq 0,999$ menunjukkan bahwa metode memiliki linieritas yang sangat baik. Parameter statistik lain yang penting dilaporkan adalah standar deviasi dari slope (Sb) yang dihitung untuk memperkirakan variabilitas slope, serta confidence interval (CI) slope pada tingkat kepercayaan tertentu (misalnya 95%). Confidence interval slope menunjukkan rentang nilai di mana slope populasi sebenarnya diperkirakan berada, sehingga menambah keyakinan bahwa hubungan linier tersebut konsisten. Pelaporan nilai Sb dan CI slope sangat penting karena mendukung validitas interpretasi kurva kalibrasi dan memastikan akurasi kuantifikasi analit dalam rentang konsentrasi yang diuji. Evaluasi linieritas menjadi bagian penting dalam verifikasi metode sesuai ketentuan ISO/IEC 17025:2017 dan ICH Q2(R1), karena menjamin akurasi hasil dalam rentang pengukuran yang digunakan (ICH

Q2(R1), 2005; ISO/IEC 17025:2017; Snyder et al., 2011; Harmita, 2004).

2.5.4 LoD dan LoQ

Limit of Detection (LoD) dan Limit of Quantification (LoQ) merupakan dua parameter penting dalam verifikasi metode yang digunakan untuk menilai seberapa sensitif suatu metode analisis dalam mendeteksi dan mengukur suatu zat. LoD adalah batas deteksi terkecil, yaitu konsentrasi analit paling rendah yang masih dapat terdeteksi oleh instrumen, namun belum dapat dihitung secara tepat. Sebaliknya, LoQ adalah batas kuantifikasi terkecil, yaitu konsentrasi terendah dari analit yang masih dapat diukur secara akurat dan presisi. Perhitungan nilai LoD dan LoQ umumnya dilakukan dengan menggunakan standar deviasi dari respon sinyal (σ), biasanya berasal dari pengukuran blanko atau konsentrasi rendah, serta kemiringan (slope) dari kurva kalibrasi (s). Rumus perhitungan LoD dan LoQ adalah sebagai berikut:

$$LoD = 3,3 \times \frac{\sigma}{s}$$

$$LoQ = 10 \times \frac{\sigma}{s}$$

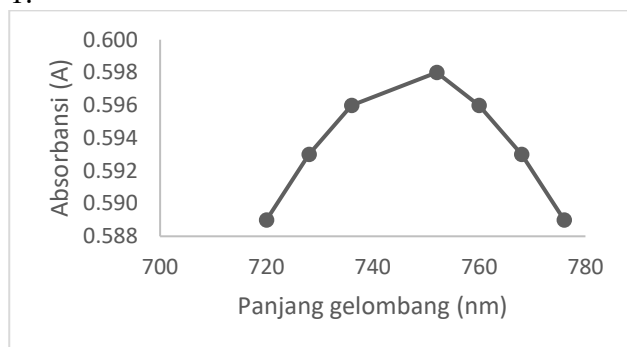
Simbol σ menyatakan simpangan baku respons (biasanya dari blanko), dan s adalah kemiringan garis kalibrasi dari regresi linier. Semakin kecil nilai LoD dan LoQ yang dihasilkan, maka semakin baik sensitivitas metode tersebut, karena mampu mendeteksi dan mengukur analit dalam jumlah yang sangat kecil. Oleh karena itu, parameter ini sangat penting terutama dalam analisis senyawa aktif kadar rendah seperti kandungan zat dalam ekstrak tumbuhan. Penilaian LoD dan LoQ merupakan bagian penting dari proses validasi atau verifikasi metode analisis sesuai dengan standar internasional yang tercantum dalam ICH Q2(R1), ISO/IEC 17025:2017, dan literatur ilmiah yang relevan (ICH, 2005; ISO, 2017; Harmita, 2004).

3. Pembahasan

3.1 Panjang gelombang maksimum larutan asam galat



Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks) larutan standar asam galat setelah bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu bertujuan untuk mengetahui titik serapan tertinggi, yaitu saat senyawa paling efektif menyerap cahaya. Pengukuran spektrum absorbansi dilakukan pada rentang 600–800 nm dan menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum tercapai pada 752 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,598. Panjang gelombang ini menunjukkan bahwa asam galat menyerap cahaya paling kuat pada titik tersebut setelah membentuk kompleks berwarna biru dengan reagen Folin. Penetapan λ maks sangat penting karena pengukuran yang dilakukan pada titik ini memberikan sensitivitas dan akurasi terbaik dalam penetapan kadar senyawa fenolik seperti asam galat (Ganjar, 2020; Singleton et al., 1999; Waterhouse, 2002). Sebaliknya, jika pengukuran dilakukan di luar panjang gelombang maksimum, respons instrumen dapat berkurang dan hasil analisis menjadi kurang representatif. Nilai absorbansi larutan asam galat pada konsentrasi 70 $\mu\text{g/mL}$ ditampilkan pada Gambar 1.

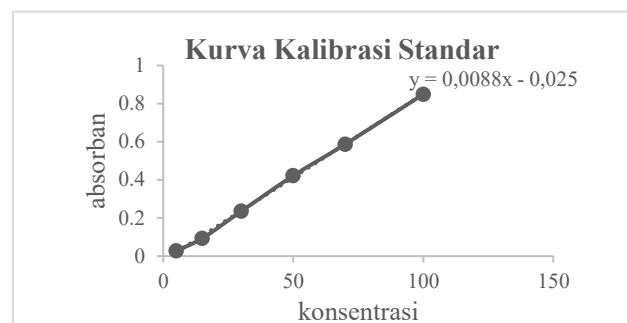


Gambar 1. Kurva panjang gelombang maksimum asam galat

3.2 Uji Linieritas

Linearitas merupakan salah satu parameter penting dalam verifikasi metode kuantitatif yang menggambarkan kemampuan suatu metode menghasilkan respon instrumen yang sesuai dengan perubahan konsentrasi analit dalam rentang tertentu. Uji linearitas bertujuan untuk memastikan bahwa peningkatan konsentrasi analit diikuti oleh peningkatan respon instrumen yang konsisten, sehingga hubungan antara keduanya dapat digunakan sebagai dasar yang valid dan untuk menghitung kadar analit. Pengujian dilakukan dengan mengukur sejumlah

larutan standar pada konsentrasi bertingkat, kemudian memplotkan nilai respon terhadap konsentrasi untuk memperoleh kurva kalibrasi (ICH Q2(R1), 2005; Harmita, 2004).



Gambar 2. Kurva kalibrasi pembanding asam galat

Tabel 2. Data kurva kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	ABS
5	0,0283
15	0,0929
30	0,2353
50	0,4217
70	0,5871
100	0,8492

Hubungan antara konsentrasi (x) dan respon (y) dianalisis melalui regresi linier dengan persamaan $y = bx + a$, di mana b merupakan slope yang mencerminkan sensitivitas metode, dan a adalah intersep yang menunjukkan nilai respon saat konsentrasi nol. Linearitas dinilai dari koefisien determinasi (R^2), yang menunjukkan seberapa baik data mengikuti garis regresi. Nilai R^2 yang mendekati 1 mengindikasikan hubungan. Kurva kalibrasi pembanding asam galat linier yang kuat dan menunjukkan bahwa metode mampu menghasilkan data yang konsisten dalam rentang konsentrasi yang diuji (ICH Q2(R1), 2005; Harmita, 2004).

Dalam penelitian ini, data kurva kalibrasi standar asam galat (Gambar 2, Tabel 2 dan Tabel 3), terlihat bahwa kenaikan konsentrasi (5–100 ppm) diikuti oleh peningkatan absorbansi secara konsisten, menunjukkan tren linear yang sangat baik dengan persamaan regresi $y = 0,0088x - 0,025$ dan koefisien determinasi (r^2) mendekati 1. Nilai slope positif (0,0088) menunjukkan sensitivitas metode yang baik, sementara intersep negatif kecil ($-0,025$) tidak memberikan

pengaruh signifikan terhadap akurasi. Pola kenaikan absorbansi yang teratur menegaskan bahwa respon instrumen berbanding lurus dengan konsentrasi analit, sehingga mendukung validitas kurva kalibrasi dan linearitas metode dalam rentang pengujian (ICH Q2(R1), 2005; AOAC, 2016; Harmita, 2004).

Linearitas yang baik ini memastikan bahwa metode dapat digunakan untuk mengukur rentang konsentrasi yang luas dengan ketepatan dan akurasi yang tinggi, serta meminimalkan risiko sistematik dalam kuantifikasi. Kombinasi dari Tabel 3. presisi yang tinggi dan linearitas yang valid ini membuktikan bahwa metode spektrofotometri UV-Vis dengan reagen Folin–Ciocalteu layak digunakan dalam analisis fenol total, tidak hanya pada ekstrak teh hijau, tetapi juga potensial diterapkan pada berbagai jenis ekstrak tanaman lain, selama dilakukan evaluasi parameter sesuai konteks penggunaannya.

Hal ini membuktikan bahwa metode spektrofotometri UV-Vis dengan reagen Folin–Ciocalteu memiliki ketepatan untuk penetapan kadar fenol total pada sampel ekstrak teh hijau, serta bisa digunakan sebagai dasar verifikasi metode yang dapat diaplikasikan pada ekstrak herbal lain dengan karakteristik serupa. Sehingga metode ini memenuhi kriteria linearitas yang dipersyaratkan untuk analisis kuantitatif (ICH Q2(R1), 2005; Harmita, 2004).

3.3 Uji Presisi

Pengujian presisi dilakukan dengan mengukur satu jenis sampel homogen sebanyak tujuh kali secara berurutan dalam kondisi identik, mencakup alat, pelaksana, waktu, dan lingkungan kerja. Tujuan pengujian ini untuk mengamati kestabilan hasil pengukuran dalam kondisi jangka pendek atau repeatability.

Data konsentrasi dari tiap pengukuran dihitung nilai rata-ratanya, disertai simpangan baku (SD) dan persentase koefisien variasi (%RSD). Perhitungan %RSD dilakukan dengan membandingkan nilai SD terhadap rata-rata hasil pengukuran, lalu dikalikan seratus. Nilai %RSD $\leq 2\%$ menunjukkan presisi sangat baik untuk metode spektrofotometri pada kisaran konsentrasi sedang, sedangkan nilai hingga 5% masih dapat diterima untuk sampel kompleks seperti ekstrak tanaman. Hasil ulangan yang konsisten mencerminkan kinerja metode yang dapat diandalkan, sesuai prinsip validasi metode berdasarkan ISO/IEC 17025:2017 dan pedoman internasional lainnya (ICH Q2(R1), 2005; AOAC, 2016; Harmita, 2004).

Berdasarkan Tabel 3, hasil uji presisi menunjukkan bahwa nilai kadar fenol total (dinyatakan sebagai mg GAE/g) pada tujuh ulangan berkisar antara 405,798 hingga 428,264 mg GAE/g dengan rata-rata 419,17 mg GAE/g, simpangan baku (SD) sebesar 7,01, dan persen koefisien variasi (%RSD) sebesar 1,67%. Nilai %RSD yang rendah ($<2\%$) menunjukkan bahwa metode ini memiliki kestabilan dan keterulangan hasil yang sangat baik dalam kondisi analisis yang sama (repeatability), sehingga mendukung ketepatan dan keandalan metode spektrofotometri UV-Vis Instrumen yang digunakan kondisi repeatability sesuai standar laboratorium (ISO/IEC 17025:2017) dengan reagen Folin–Ciocalteu dalam penetapan kadar fenol total. Konsistensi antar ulangan yang ditunjukkan oleh distribusi hasil yang rapat memperkuat keyakinan bahwa metode ini dapat diaplikasikan secara rutin dengan tingkat presisi yang tinggi dan hasil yang baik. Nilai ini menandakan bahwa variasi antar pengukuran tergolong rendah dan metode ini memberikan

Tabel 3. Data Analisa Uji Presisi

Ulangan	Absorban	a (slope)	b (intercept)	$\mu\text{g/mL}$	mg AG E/g	Rata-rata fenol total	SD mg AG E/g	% RSD
1	0,340	0,009	0,025	42,099	420,361			
2	0,341	0,009	0,025	41,787	417,657			
3	0,351	0,009	0,025	42,848	428,264			
4	0,331	0,009	0,025	40,600	405,798	419,17	7,01	1,67
5	0,343	0,009	0,025	41,946	419,245			
6	0,347	0,009	0,025	42,474	424,523			
7	0,342	0,009	0,025	41,859	418,381			



hasil yang konsisten, sehingga dapat digunakan secara baik dalam penetapan fenol total pada ekstrak teh hijau (ICH Q2(R1), 2005; AOAC, 2016; Harmita, 2004).

3.4 Uji Akurasi

Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (% recovery), yang dihitung berdasarkan selisih kadar analit setelah dan sebelum penambahan spike, dibandingkan dengan kadar spike secara teori. Penilaian dilakukan dengan metode penambahan baku atau simulasi placebo-spike menggunakan larutan standar murni atau Certified Reference Material (CRM). Nilai recovery yang berada dalam kisaran 80–120% (untuk matriks kompleks) atau 90–110% (untuk matriks sederhana) dianggap memenuhi syarat akurasi yang baik (Handoyo et al., 2022; Harmita, 2004). Untuk meminimalkan galat sistematis, proses analisis harus dilakukan menggunakan peralatan terkalibrasi, bahan standar dengan kemurnian tinggi, dan mengikuti

prosedur baku operasional yang tervalidasi secara interval (Nurwanti et al., 2024; AOAC, 2016).

Dalam penelitian ini, parameter akurasi dievaluasi menggunakan pendekatan penambahan standar (standard addition method), di mana larutan standar asam galat dengan konsentrasi diketahui ditambahkan ke dalam matriks sampel ekstrak teh hijau. Nilai akurasi dinyatakan dalam bentuk persen perolehan kembali (% recovery), yang mencerminkan sejauh mana metode mampu mengukur kembali analit yang ditambahkan secara tepat (ICH Q2(R1), 2005). Pengujian dilakukan pada tiga tingkat konsentrasi spike, yaitu 5 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm, untuk menilai konsistensi metode dalam berbagai tingkat kandungan asam galat (AOAC, 2016). Hasil pengujian menunjukkan persentase recovery yang menggambarkan kemampuan metode dalam mengukur kandungan fenol total secara akurat pada sampel, serta mencerminkan kontrol terhadap potensi galat sistematis selama proses analisis (Handoyo et al., 2022).

Tabel 4. Data analisa akurasi

Ulangan	Konsentrasi sampel tanpa spike (ppm)	Spike Ditambahkan (ppm)	Konsentrasi asam galat teori (ppm)	Konsentrasi Terukur (ppm)	Konsentrasi spike terukur (ppm)	Recovery (%)
1	40,74	5	5,65	46,60	5,86	103,66
2	41,78		5,65	47,54	5,75	101,84
3	41,91		5,65	47,89	5,98	105,81
1	42,05	50	50,86	92,81	50,76	99,81
2	43,20		50,86	93,68	50,49	99,27
3	40,88		50,86	91,55	50,67	99,63
1	41,94	100	99,57	141,28	99,34	99,77
2	41,28		99,57	139,42	98,15	98,57
3	42,13		99,57	141,18	99,06	99,48

Rerata % Recovery

Hasil uji akurasi (Tabel 4) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 5 ppm, nilai % recovery berkisar antara 101,84% hingga 105,81%, dengan rata-rata 103,77%. Pada konsentrasi 50 ppm, nilai recovery berada di kisaran 99,27%–99,81%, sedangkan pada 100 ppm berkisar 99,48%–99,77%. Rata-rata % recovery dari ketiga level adalah 101,40% yang masih dalam

batas akurasi yang dapat diterima (80–110%) menurut pedoman validasi metode (Snyder et al., 2011; Saman et al., 2021). Hasil ini membuktikan bahwa metode analisis mampu mengukur kadar fenol total dengan presisi dan akurasi yang baik, sesuai prinsip pengendalian mutu dalam ISO/IEC 17025.



3.5 LoD dan LoQ

Tabel 5. Data LoD dan LoQ

Konsentrasi	Absorban	a (slope)	b (intercept)	y'	y-y'	(y-y') ²
0,000	0,000	0,009	0,025	0,025	-0,025	0,001
5,000	0,028	0,009	0,025	0,069	-0,041	0,002
15,000	0,093	0,009	0,025	0,157	-0,064	0,004
30,000	0,235	0,009	0,025	0,289	-0,054	0,003
50,000	0,422	0,009	0,025	0,465	-0,043	0,002
70,000	0,587	0,009	0,025	0,641	-0,054	0,003
100,000	0,849	0,009	0,025	0,905	-0,056	0,003
Total						0,017

Jumlah data (n)	7
n-1	6
SD	0,05
LoD	7,06
LoQ	21,40

Hasil penelitian menunjukkan nilai LoD sebesar 7,06 ppm dan LoQ sebesar 21,40 ppm. Metode ini digunakan untuk mengukur kadar fenol total dalam ekstrak, dengan batas minimal yang ditetapkan dalam Farmakope Herbal Indonesia Edisi II sebesar $\geq 0,35\%$ atau 3.50 mg/L. Nilai LoD dan LoQ yang jauh lebih rendah dari batas tersebut menunjukkan bahwa metode ini memiliki sensitivitas yang memadai. Sesuai ISO/IEC 17025:2017, kriteria keberterimaan ditentukan berdasarkan kesesuaian metode terhadap tujuan analisis. Dengan demikian, metode ini dinyatakan memenuhi kriteria keberterimaan dan layak digunakan untuk analisis fenol total (ICH Q2(R1), 2005; ISO/IEC 17025:2017; Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, 2017).

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil verifikasi yang telah dilakukan, metode analisis untuk penetapan kadar fenol total dalam ekstrak menunjukkan performa yang dapat diterima sesuai dengan pedoman ICH Q2(R1) dan prinsip-prinsip ISO/IEC 17025:2017. Parameter linearitas tercapai dengan baik ($r^2 = 0,9993$), presisi menunjukkan nilai %RSD sebesar 1,67%, dan akurasi tercermin dari nilai recovery sebesar

101,40%, yang semuanya berada dalam batas keberterimaan.

Meskipun proses verifikasi dilakukan menggunakan ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*), metode ini memiliki karakteristik umum yang memungkinkan penerapannya pada berbagai jenis ekstrak tanaman lain, selama dilakukan evaluasi parameter yang sesuai dengan konteks penggunaannya. Hal ini mendukung pemenuhan persyaratan mutu dan keandalan hasil uji di laboratorium pengujian yang mengacu pada sistem manajemen mutu ISO/IEC 17025.

Implikasi praktis dari hasil ini adalah metode yang telah diverifikasi dapat direkomendasikan untuk diterapkan di laboratorium uji lain sebagai acuan standar dalam penetapan kadar fenol total pada sampel herbal, sehingga dapat meningkatkan harmonisasi prosedur analisis, memperkuat validitas data, serta mendukung pengembangan dan sertifikasi produk fitofarmaka secara lebih luas.

5. Ucapan Terima Kasih

Saya mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin dan kepala Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi telah mendukung untuk penelitian ini.



6. Daftar Pustaka

- AOAC International. (2016). Guidelines for validation of analytical methods for the AOAC Official Methods of Analysis (20th ed.). AOAC International.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods used in medicinal plants: Principles, strengths, and limitations. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- European Commission. (2021). SANTE/11312/2021: Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (Version 1). Publications Office of the European Union. https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-12/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2012). Kimia farmasi analisis. Pustaka Pelajar.
- Hadi, A., & Asiah. (2020). Verifikasi metode pengujian air dan air limbah: Mendukung penerapan ISO/IEC 17025:2017. Balai Teknologi Laboratorium Lingkungan – Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants (pp. 21–54). ICS-UNIDO.
- Handoyo, A., Santoso, B., & Riyadi, S. (2022). Validasi metode analisis kuantitatif pada sediaan farmasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 11(2), 101–109. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v11i2.42189>
- Harmita. (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117–135. <https://journal.farmasi.ui.ac.id/index.php/jfikk/article/view/338> (jika tersedia, link jurnal atau pdf)
- International Conference on Harmonisation. (2005). ICH Q2(R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Expert Working Group. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- International Organization for Standardization. (2017). ISO/IEC 17025:2017 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2013). Farmakope Herbal Indonesia (Edisi I). Kementerian Kesehatan RI.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2017). Farmakope Herbal Indonesia (Edisi II, Suplemen I). Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan.
- Nurwanti, S., Suryani, E., & Sari, D. (2024). Implementasi sistem manajemen mutu ISO/IEC 17025:2017 pada laboratorium pengujian material konstruksi Kabupaten Badung. *Jurnal Syntax Admiration*, 6(1), 199–207. <https://doi.org/10.46799/jsa.v6i1.2024>
- Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S. J., & Shahabimajid, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142–1145. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/42883>
- Saman, M. S., Mulyani, T., & Rahayu, I. (2021). Validasi metode spektrofotometri untuk penetapan flavonoid total ekstrak etanol daun belimbing wuluh. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 19(1), 67–74. <https://doi.org/10.35814/jifi.v19i1.2320>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). Introduction to modern liquid chromatography (3rd ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118022830>
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), 11.1.1–11.1.8.



<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0101s00>

Yuwono, M., & Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. In H. G. Brittain (Ed.), Profiles of drug substances, excipients and related methodology (Vol. 32, pp. 243–259). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(05\)32009-0](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32009-0).

