

Validasi Metode Penetapan Kadar Alkaloid pada Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica L.*) Secara Spektrofotometri UV-Vis

Validation of the Method of Determining Alkaloid Levels in Tamarind Leaf Ethanol Extract (*Tamarindus indica L.*) UV-Vis Spectrophotometry

Sherly Sumarnita Yolanda*, Prisma Trida Hardani, Amanda Safithri Sinulingga

Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Kesehatan, Universitas PGRI Adi Buana Surabaya, Indonesia

*Email Korespondensi: sherlysy22@gmail.com

Abstrak

Kriteria validasi (batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ, linearitas, akurasi, presisi) menggunakan spektrofotometri UV-visibel untuk penentuan kandungan alkaloid pada ekstrak etanol daun asam jawa (*Tamarindus indica L.*). Hasil validasi metode analisis yang digunakan untuk mengetahui kandungan alkaloid total ekstrak daun asam jawa (*Tamarindus indica L.*) sesuai dengan kriteria validasi metode analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Jika hasil regresi linier untuk uji linieritas adalah $y = 0,0742x + 0,1239$ maka koefisien korelasi (r) sebesar 0,9972; spesifisitas sangat baik, batas deteksi (LOD) 0,0375 ppm, batas kuantifikasi (LOQ) 0,1251 ppm, hasil pengujian presisi sedang dengan konsentrasi sedang, nilai kinerja rata-rata Presisi pengujian sebesar 107,64% dan mean -mean RSD-% dari mean hasil pengujian presisi adalah $1,0543 \% \pm$ Kandungan total alkaloid pada ekstrak daun asam jawa (*Tamarindus indica L.*) rata-rata 1,6467 persen massa $\pm 0,0869$. Studi menunjukkan bahwa daun asam jawa rata-rata mengandung $2,189 \pm 0,047$ ppm alkaloid positif.

Kata Kunci: Alkaloid, Spektrofotometri UV-Vis, Validasi Metode

Abstract

Validation criteria (detection limit (LOD), quantification limit (LOQ, linearity, accuracy, precision) using UV-visible spectrophotometry for determination of alkaloid content in tamarind leaf ethanol extract (*Tamarindus indica L.*). The results of the validation of the analytical method used to determine the total alkaloid content of tamarind leaf extract (*Tamarindus indica L.*) are in accordance with the validation criteria of the analysis method using UV-Vis spectrophotometry. If the linear regression result for the linearity test is $y = 0.0742x + 0.1239$ then the correlation coefficient (r) is 0.9972; excellent specificity, detection limit (LOD) 0.0375 ppm, quantification limit (LOQ) 0.1251 ppm, medium precision test results with medium concentration, average performance value Test precision of

107.64% and mean -mean RSD-% of mean precision test results is $1.0543\% \pm$ The total alkaloid content in tamarind leaf extract (*Tamarindus indica* L.) averages 1.6467 percent by mass ± 0.0869 . Studies show that tamarind leaves contain an average of $2,189 \pm 0.047$ ppm positive alkaloids.

Keywords: Alkaloids, UV-Vis Spectrophotometry, Method Validation

Diterima: 18 November 2023

Disetujui: 30 Agustus 2024

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v6i4.2181>



Copyright (c) 2024, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.).
Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia.
This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

Cara Sitasi:

Yolanda, S. S., Hardani, P. T., Sinulingga, A. S., 2024. Validasi Metode Penetapan Kadar Alkaloid pada Ekstrak Etanol Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) Secara Spektrofotometri UV-Vis. *J. Sains Kes.*, 6(4). 524-534.
DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v6i4.2181>

1 Pendahuluan

Indonesia adalah negara yang memiliki sumber daya alam tersebar luas di beberapa wilayah. Kekayaan alam ini dapat dijadikan potensi sumber daya yang sangat besar bagi masyarakat Indonesia. Salah satunya adalah tanaman yang mempunyai banyak manfaat. Bagian tumbuhan yang dimanfaatkan adalah batang, biji, bunga, buah, kulit kayu, daun dan sarinya. Tumbuhan mempunyai manfaat dalam kehidupan manusia tidak hanya sebagai bahan baku utama, tetapi juga sebagai bahan masakan, tanaman hias dan obat-obatan. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat di masyarakat adalah daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.). [1].

Daun asam jawa mengandung beberapa komponen seperti lemak, protein, serat, dan asam tartarat. Selain itu, daun asam jawa juga mengandung mineral seperti natrium, kalium, fosfor, magnesium, kalsium, dan belerang. Daun asam jawa juga mengandung metabolit sekunder seperti tanin, saponin, flavonoid, dan alkaloid [2].

Alkaloid merupakan metabolit sekunder yang mengandung atom nitrogen dan terdapat pada jaringan tumbuhan dan hewan. Terdapat banyak senyawa alkaloid berasal dari tumbuhan, terutama angiospermae. Lebih dari 20% spesies angiospermae mengandung alkaloid. Alkaloid terdapat di berbagai bagian tumbuhan, antara lain bunga, biji, daun, ranting, akar, dan kulit kayu. Alkaloid umumnya terdapat dalam jumlah kecil sehingga perlu dipisahkan dari campuran kompleks senyawa yang berasal dari jaringan tanaman [3].

Untuk mendapatkan senyawa alkaloid dapat menggunakan beberapa metode ekstraksi, seperti metode refluks, pengertian metode refluks sendiri adalah metode yang digunakan untuk mengumpulkan sampel yang relatif tahan panas. Dalam metode ini, sampel direbus dalam waktu singkat, biasanya antara 3 dan 7 jam, dalam pelarut yang ditempatkan dalam wadah yang dilengkapi kondensor [4]. Di sisi lain, perkolasi adalah jenis proses ekstraksi dingin. Ekstraksi tidak menggunakan panas sehingga senyawa yang dikandungnya tidak rusak [5].

Untuk mengukur kandungan alkaloid pada ekstrak daun asam jawa, perlu dilakukan pengukuran kandungan alkaloid pada ekstrak daun asam jawa. Beberapa metode penetapan kadar alkaloid yaitu salah satunya dengan menggunakan metode spektrofotometri. Metode spektrofotometri adalah Sebuah metode sederhana untuk mengukur sejumlah kecil zat. Selain itu, metode ini sederhana, cepat, dan sangat akurat. Sampai saat ini belum ada peneliti yang mengetahui kandungan senyawa alkaloid pada daun asam jawa (*Tamarindus indica L.*) [6]. Pada penelitian sebelumnya, didapatkan dari hasil uji kualitatif, diketahui bahwa ekstrak daun asam jawa positif mengandung alkaloid, sehingga pada penelitian ini peneliti ingin melakukan penetapan kadar alkaloid pada ekstrak daun asam jawa.

Untuk menetapkan kadar suatu senyawa maka diperlukan suatu hasil akurat dengan metode analisis, oleh sebab itu penelitian ini juga dilakukan validasi metode untuk menetapkan kadar alkaloid. Validasi metode adalah metode yang dilakukan untuk memastikan bahwa suatu metode analisis akurat, spesifik, dapat direproduksi, dan kuat terhadap spektrum analit yang dianalisis [7].

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Alat meliputi Batang pengaduk, cawan porselin, corong, gelas Erlenmeyer (*Pyrex*), gelas kimia (*Herma*), gelas ukur, kaca arloji, inkubator, kuvet, mikropipet (*Dragonlab*), labu tentukur, pipet tetes, pipet volume, sendok besi, spektrofotometer uv-vis (*Shimadzu 1601*), timbangan analitik (*ohaus*), toples, vial dan wadah, *rotary evaporator (DLAB RE100 PRO)*.

Bahan meliputi Aquadest, aluminium foil, etanol 96% (*Merck*), kertas perkamen, kertas saring, BCG (*Bromocresol Green (Merck)*), NaOH 2N (*kimia Jaya Labora*), Natrium Phospat (Na_2HPO_4) (*Kimia Jaya Labora*), Asam Sitrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (*Merck*), Kafein (*Kimia Jaya Labora*), Kloroform (*Aloin labora*), Kain flannel, HCl 2N (*Merck*), NaCl (*Aloin labora*), Pereaksi mayer dan wagner (*Nitra Kimia*). Bahan uji yang dipakai yaitu daun asam jawa yang di peroleh dari kota Mojokerto Jawa Timur dan determinasi tanaman dilakukan di Universitas Surabaya- Fakultas Farmasi Pusat Informasi

dan Pengembangan Obat Tradisional (PIPOT), Surabaya Jawa Timur.

2.2 Persiapan Sampel

Bagian tanaman yang digunakan adalah daun asam jawa (*Tamarindus indica L.*). Daun asam jawa yang telah dipanen dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang ikut tercampur saat panen kemudian dikeringkan dengan cara di angin-anginkan, lalu dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender.

2.3 Metode Ekstraksi

Pada tahap ini ekstrak daun asam jawa diekstraksi menggunakan metode refluks dengan suhu 70°C , 100 gram ekstrak dimasukkan kedalam labu alas bulat dengan menambahkan 300 ml etanol 96% dengan perbandingan ekstrak : etanol (1: 3). Kemudian disaring menggunakan kain flanel untuk mendapatkan filtrate, kemudian filtrate yang dihasilkan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 85°C , kemudian dilakukan pengentalan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental .

2.4 Identifikasi Senyawa Alkaloid

2.4.1 Uji Kualitatif

Ekstrak daun asam jawa yang didapatkan dari metode perkolasi dan refluks diidentifikasi kandungan alkaloidnya secara kualitatif dengan menimbang ekstrak masing-masing sebanyak 0,3 gram kemudian ditambahkan 5 ml HCl 2 N, kemudian dipanaskan sambil diaduk selama 2-3 menit. Tunggu hingga dingin kemudian ditambahkan 0,3 gram NaCl, diaduk sampai homogen lalu disaring. Filtrat yang dihasilkan kemudian ditambahkan 5 ml HCl 2 N dan dibagi menjadi tiga bagian sebagai larutan IA, IB dan IC. Ditambah pereaksi Mayer untuk larutan IA, larutan IB ditambah dengan pereaksi Wagner dan larutan IC digunakan sebagai blanko. Alkaloid ditunjukkan adanya kekeruhan atau endapan [8].

2.4.2 Uji Kuantitatif

- **Pembuatan larutan *bromocresol green (BCG)* 10^{-4}M**

Pembuatan Larutan Bromocresol Green (BCG) 10^{-4}M Larutan Bromocresol Green (BCG) dibuat dengan mencampurkan 69,8 mg

Bromocresol Green, 3 ml NaOH 2N, dan 5 ml air suling dan dipanaskan pada suhu 50-60° selama 15 menit dan bersiaplah. Panaskan selama 3 menit hingga larutan benar-benar larut, lalu encerkan dengan 1 liter. Air sulingan.

- **Pembuatan dapar fosfat pH 4,7**

Dapar fosfat pH 4,7 dibuat dalam 500 mL dengan mencampurkan 16,394 gram natrium fosfat 0,2 M (Na₂HPO₄) dan 19,212 gram asam sitrat 0,2 M (C₆H₈O₇) sehingga menghasilkan pH 4 [9].

- **Preparasi larutan induk standar kafein**

Larutan stok standar kafein dibuat dengan menimbang 0,25 gram kafein kemudian dilarutkan dalam etanol dalam labu takar 250 ml sampai tanda batas untuk menghasilkan konsentrasi 1000 [9].

- **Menentukan panjang gelombang maksimum**

Panjang gelombang puncak ditentukan dengan standar kafein 10 µg/ml yang dibuat dengan 5 ml buffer fosfat pH 4,7 dan 5 ml 10⁻⁴M bromocresol green (BCG) dan diekstraksi tiga kali dengan 5 ml kloroform. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dari 200 nm hingga 400 nm [9].

- **Menentukan operating time**

0,2 ml larutan stok kafein 100 µg/ml dipindahkan ke dalam labu takar 10 ml dan pelarut etanol ditambahkan hingga tanda batas. Absorbansi pada panjang gelombang tertinggi dibaca dari larutan hingga tercapai waktu serapan yang stabil [9].

- **Pembuatan kurva baku**

Dibuat larutan standart induk kafein dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian larutan di tambahkan 2 mL dapar fosfat dan 2 mL larutan BCG (*Bromocresol Green*). Setelah tercampur kemudian diekstraksi dengan 5 mL kloroform sebanyak 3 kali. Mengambil 0,1 mL; 0,2 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; dan 10 mL dari larutan kafein yang sudah di ekstraksi dengan kloroform kemudian di encerkan sampai 10 mL agar dapat diperoleh konsentrasi larutan yang berturut turut yaitu: 1 ppm; 2 ppm; 6 ppm; 8 ppm dan 10 ppm. Kemudian ukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum kafein

yang telah ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

2.5 Validasi Metode Analisis

2.5.1 Penyiapan Larutan Baku Induk Sampel Ekstrak Daun Asam Jawa

Larutan sampel dibuat dengan cara menimbang 5 mg ekstrak daun asam jawa, melarutkannya dalam asam klorida (HCl) 2N, dan menyaringnya. Kemudian ditambahkan 5 ml buffer fosfat pH 4,7 dan 5 ml bromocresol green (BCG) 10⁻⁴ M, campuran dikocok dan kompleks yang terbentuk diekstraksi tiga kali dengan 5 ml kloroform. Lapisan kloroform dihilangkan dan dilarutkan dengan kloroform dalam labu ukur 10 ml sampai tercapai tanda batas. Sampel disiapkan dalam rangkap tiga.

2.5.2 Uji Validasi Metode Analisis

- **Akurasi**

Pengujian akurasi dilakukan dengan menggunakan metode penjumlahan standar. Percobaan dilakukan dengan menaikkan volume larutan uji pada rentang konsentrasi 45%, 60% dan 80% sehingga diperoleh nilai persentase rendemen dan dinyatakan dengan menghitung persentase rendemen. Ketiga sampel dianalisis dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum. Hasil pengukuran dibandingkan dengan kurva standar yang dibuat, yang dengannya tingkat pemulihan dihitung. Uji presisi dilakukan dengan 3 ulangan pada setiap [9].

- **Presisi**

Uji akurasi yang dilakukan termasuk dalam kategori keterulangan. Percobaan dilakukan dengan menyiapkan larutan standar dengan konsentrasi berkisar antara 45% sampai 80% dari konsentrasi pengujian, yang diulang sebanyak 6 kali. Setiap serapan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV. Presisi didefinisikan sebagai standar deviasi (SD) atau koefisien variasi (KV). Keakuratan analisis dikatakan cukup baik jika $KV \leq 8\%$ [9].

- **Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)**

Batas deteksi dan batas kuantifikasi kadar alkaloid total secara spektrofotometri UV adalah sembilan konsentrasi di bawah

konsentrasi terendah uji linieritas. Nilai terukur juga dapat diperoleh dari nilai b (kemiringan) persamaan linier $y = a + bx$, dimana simpangan nol sama dengan simpangan baku sisa (Sy/x) [9].

- **Spesifisitas**

Spesifisitas sampel dan larutan standar pada konsentrasi 10 ppm. Ke dalam larutan ditambahkan 2 mL HCl, 5 mL BCG, 5 mL buffer fosfat, pH 4,7, dan dicuci dengan 5 mL kloroform menggunakan corong pisah. Fase kloroform diambil. Absorbansi larutan dibaca dengan nilai maksimum λ . Spektrum sampel yang dihasilkan dibandingkan dengan standar [9].

- **Linieritas**

Linearitas ditentukan dengan mengukur serapan larutan stok standar pada suatu rentang konsentrasi, membentuk delapan titik konsentrasi dalam rentang konsentrasi 0-200% yang diukur pada panjang gelombang maksimum. Hasil penyerapan yang diperoleh dianalisis dengan membuat persamaan regresi linier dan menentukan koefisien korelasi. Anda dapat menentukan linearitas hasil analisis Anda.[9].

2.6 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Untuk setiap metode ekstraksi, larutan sampel dibuat dengan cara menimbang 5 mg ekstrak daun asam jawa, melarutkannya dalam asam klorida (HCl) 2 N dan menyaringnya. Kemudian ditambahkan 5 ml buffer fosfat pH 4,7 dan 5 ml bromocresol green (BCG), campuran dikocok dan kompleks yang terbentuk diekstraksi tiga kali dengan 5 ml kloroform. Lapisan kloroform diambil dan dilarutkan dalam labu takar 10 ml yang berisi kloroform hingga mencapai tanda berhenti. sampel disiapkan dalam rangkap tiga. Semua blanko direagen tanpa diekstraksi larutannya, kemudian diambil fasa kloroformnya. Penyerapan diukur pada panjang gelombang tertinggi. Konsentrasi alkaloid total ditentukan dengan menginterpolasi absorbansi analit ke dalam persamaan regresi linier standar kafein untuk mendapatkan konsentrasi (x) dalam $\mu\text{g/ml}$. Kadar alkaloid dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi $y = bx + a$ [9].

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Preparasi Sampel

Langkah-langkah penyiapan sampel meliputi pencucian, pengeringan dan pengabuan sampel, sampel daun asam yang dihasilkan dipisahkan dari batangnya dan dicuci. air bersih untuk menghilangkan debu, kotoran atau kotoran lain yang mungkin mengganggu proses ekstraksi, kemudian letakkan di atas loyang dan keringkan selama 3 hari. Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan di bawah sinar matahari, karena tujuan pengeringan dengan metode ini adalah untuk mengawetkan senyawa-senyawa bioaktif yang ada dalam simplis dan tujuannya untuk menghilangkan kandungan air pada sampel serta mencegah munculnya mikroba [10]. Kemudian simplis tersebut dihaluskan dengan blender selama 2 menit kemudian dimasukkan ke dalam sampel. paruh, tutup dengan aluminium foil dan simpan pada suhu ruangan. Hasil pretreatment sampel menunjukkan berat daun asam jawa sebesar 489,38 g, berat daun asam jawa kering 300 g, dan berat daun asam jawa 250 g.

3.2 Metode Ekstraksi

Pada tahap ini daun asam jawa diekstraksi menggunakan metode refluks pada suhu 90°C dan perbandingan serbuk sederhana dengan etanol (1:3). Sebanyak 100 gram serbuk daun asam jawa dimasukkan ke dalam gelas kimia berisi 300 ml etanol 96% dan dimasukkan ke dalam labu bulat, ekstraksi dilanjutkan selama 3 jam, kemudian ekstrak yang dihasilkan disaring melalui penyaring tahu dan disimpan dalam penyaring. . gelas kimia tertutup rapat dengan aluminium foil di lemari es. Filtrat yang dihasilkan diuapkan dalam rotary evaporator pada suhu 85°C selama 4 hari, diperoleh 150 ml dari 750 ml filtrat yang telah mengalami proses penguapan. Pengembunan ekstrak dilakukan pada hot plate pada suhu 70°C selama 8 jam. foil. Rendemen buah asam jawa dengan metode perkolasi sebanyak 23,786 gram dengan berat ekstraksi 9,5%, sehingga dapat disimpulkan rendemen ampas asam jawa memenuhi persyaratan Farmakope herbal.

3.3 Uji Kualitatif Identifikasi Senyawa Alkaloid

Uji kualitatif yang dilakukan memberikan hasil bahwa metode refluks mengandung alkaloid yang menunjukkan adanya endapan hitam pada sampel, sedangkan metode perkolasi tidak terdapat endapan yang berarti tidak ada kandungan alkaloid terdeteksi.

Pada penelitian ini digunakan etanol A 96% sebagai pelarut polar, sehingga diperoleh hasil dari metode refluks alkaloid lebih banyak larut karena adanya efek pemanasan. Penelitian yang dilakukan oleh Buanasarid dkk (2018) menunjukkan bahwa metode ekstraksi celup, ekstrak etanol ekstrak asam jawa positif mengandung alkaloid jika diuji dengan pereaksi Wagner dan negatif jika diuji dengan pereaksi perantara, sedangkan pada penelitian ini bersifat kualitatif. diuji dengan reagen Mayer dan Wagner pada metode refluks positif mengandung alkaloid.

3.4 Uji Kuantitatif Identifikasi Senyawa Alkaloid

Pada penelitian ini dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui kandungan dan kadar senyawa alkaloid pada ekstrak daun asam jawa.

3.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pada pengujian kuantitatif senyawa alkaloid pada ekstrak daun asam jawa, langkah pertama yang dilakukan adalah menentukan panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dimana zat memberikan serapan terbesar. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang yang sensitivitasnya juga paling tinggi, karena perubahan serapan per satuan konsentrasi paling besar pada panjang gelombang maksimum tersebut. Pada panjang gelombang tertinggi, jika pengukuran dilakukan beberapa kali, kesalahan yang dihasilkan sangat kecil [10].

Penentuan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini menggunakan larutan kafein yang dilarutkan dengan etanol kemudian ditambahkan larutan BCG dan juga larutan dapar fosfat lalu diekstraksi dengan kloroform sebanyak 3 kali. Menurut [11] panjang gelombang maksimum kafein yang

didapatkan berdasarkan literatur penentuan panjang gelombang adalah 273 nm. Secara teoritis, panjang gelombang maksimum yang dihasilkan berdasarkan penentuan panjang gelombang adalah 273 nm [12]. Panjang gelombang maksimum pada penelitian ini didapatkan pada panjang gelombang 272,5 nm dengan nilai absorbansi 1,1318.

3.4.2 Penentuan Operating Time

Maksud dari waktu pengerjaan tersebut adalah agar reaksi dapat berjalan sempurna sehingga terbentuk serapan larutan yang stabil [13]. Pada penelitian ini, untuk menentukan lama aktivitas, 0,2 mL larutan stok kafein 100 µg/mL dipindahkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan pelarut etanol sampai tanda, kemudian ditambahkan larutan BCG dan buffer fosfat. Hasil ekstraksi kemudian diekstraksi sebanyak 3 kali dengan kloroform, dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, kemudian dibaca serapan larutan pada panjang gelombang maksimum 272,5 nm hingga tercapai waktu serapan yang stabil, dikatakan stabil jika nilai absorbansi tidak berubah pada jumlah waktu yang di tentukan. Hasil dari *operating time* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. *Operating Time*

Waktu	Absorbansi
Menit ke 0	0,0004
Menit ke 10	0,0530
Menit ke 20	0,1829
Menit ke 30	0,2677
Menit ke 40	0,2997
Menit ke 50	0,2994
Menit ke 60	0,2994
Menit ke 70	0,2998

Pada penelitian ini penentuan *operating time* didapatkan absorbansi yang stabil pada pada menit ke-40. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang diperoleh untuk *operating time* adalah dari 43-50 menit [14], sehingga waktu yang diperlukan agar larutan stabil pada saat diuji adalah 40 menit setelah pembuatan larutan. Penelitian yang telah dilakukan oleh [9] pada hasil penentuan *operating time* diperoleh absorbansi yang stabil pada menit ke 30. Penentuan *operating time* dilakukan agar dapat mendapatkan reaksi yang sempurna dan stabil [9].

3.5 Validasi Metode Analisis Secara Spektrofotometri Uv-Vis

Pada tahapan ini dilakukan validasi metode penetapan kadar alkaloid menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada ekstrak daun asam jawa. Validasi metode ini dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis tersebut akurat, spesifik, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Validasi metode yang dilakukan meliputi, linieritas, LOD dan LOQ, spesifisitas, presisi dan akurasi [7].

3.5.1 Spesifisitas

Spesifisitas atau selektivitas adalah kemampuan suatu metode untuk menganalisis dan mengukur analit target secara akurat dengan adanya komponen lain dari matriks sampel, seperti pengotor, produk degradasi, dan komponen matriks [15]. Pengukuran spesifisitas dilakukan dengan membandingkan spektrum sampel standar dan sampel yang diekstraksi. Hasil uji spesifisitas ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil spesifisitas

Larutan	Panjang Gelombang	Absorbansi
Standar	275,3 nm	2,9715
Sampel	275,2 nm	1,5053

Penelitian yang telah dilakukan [11] mendapatkan hasil panjang gelombang standart kafein sekitar 274 nm dan sampel sekitar 275 nm. Begitu pula penelitian yang dilakukan [3] mendapatkan hasil panjang gelombang sampel sekitar 275 nm dan standart sekitar 273 nm. Pada Uji atau pengujian panjang gelombang maksimum berarti nilai maksimum yang diperoleh akurat atau berjarak ± 2 nm dari panjang gelombang yang ditentukan [16]. Oleh karena itu, sampel dengan panjang gelombang maksimum 274 atau 275 nm masih dapat diterima.

Berdasarkan perbandingan spektrum kafein standar mempunyai panjang gelombang 275,3 nm dengan serapan 2,9715, sedangkan sampel daun asam jawa yang diekstraksi mempunyai panjang gelombang 275,2 nm dan serapan 1,5035. Berdasarkan hasil perbandingan yang diperoleh menunjukkan kedekatan panjang gelombang spektrum

standar dan spektrum sampel. Hal ini menunjukkan bahwa sampel mengandung alkaloid sehingga metode analisis mempunyai spesifisitas pengukuran yang baik.

3.5.2 Linieritas

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk menghasilkan hasil yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam kisaran yang ada dalam sampel. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu standar dalam mendeteksi analit. Linearitas adalah metode untuk menentukan seberapa baik kurva kalibrasi menghubungkan respons (y) terhadap konsentrasi serapan (x) [17].

Uji linieritas dilakukan dengan menyiapkan 5 konsentrasi larutan standar kafein yaitu 1 ppm, 2 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar kafein dengan konsentrasi 1, 2, 6, 8 dan 10 ppm, berturut-turut adalah 0,1752; 0,3005; 0,5735; 0,6987; dan 0,8784. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan standar kafein yang diukur maka daya serapnya pun semakin tinggi. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi yang lebih tinggi maka konsentrasi senyawa kafein juga semakin tinggi.

Hasil data absorbansi dapat diperoleh persamaan garis regresi $y = bx + a$ dan nilai koefisien korelasi (r). Nilai koefisien korelasi yang mendekati 1 menunjukkan absorbansi dengan konsentrasi analit memiliki hubungan yang linear [18] Hasil uji linieritas didapatkan hasil persamaan garis regresi $y = 0,0742x + 0,1239$ dengan nilai $r = 0,99729$. Rohma, dkk [7] menyatakan bahwa peningkatan garis linear pada kurva kalibrasi dapat menunjukkan hubungan yang linear antara konsentrasi dengan absorbansi [7].

3.5.3 Limit Of Detection (LOD) and Limit Of Quantitation (LOQ)

Berdasarkan perhitungan yang dilakukan, nilai LOD sebesar 0,0375 ppm yang berarti sampel masih dapat diukur pada konsentrasi yang memberikan keakuratan alat berdasarkan tingkat presisi individu dari hasil analisis, sedangkan nilai LOQ adalah 0,1251 ppm yang berarti pada konsentrasi tersebut pengukuran masih dapat memberikan keakuratan analisis [9].

3.5.4 Akurasi

Presisi adalah ukuran seberapa dekat hasil analit dengan kadar analit sebenarnya. Hasil uji presisi dapat dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali analit yang ditambahkan ke sampel [19]. Metode aditif standar digunakan untuk pengujian akurasi yaitu larutan standar dan sampel dianalisis pada tiga konsentrasi berbeda yaitu 45%, 60%, 80%. Setiap konsentrasi direplikasi sebanyak 3 kali. Hasil pasti dari penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 4.

Hasil uji akurasi pada penambahan adisi 45% didapatkan hasil rata-rata %recovery yaitu 104,45%, pada adisi 60% didapatkan hasil rata-rata %recovery yaitu 110,43%, pada adisi 80% didapatkan hasil rata-rata %recovery yaitu

108,06%. Nilai tersebut memenuhi persyaratan %recovery yaitu 75-120% [20]. Hal tersebut menjelaskan bahwa % recovery yang dihasilkan berada pada batas yang dipersyaratkan sehingga dapat dikatakan bahwa metode spektrofotometri UV-Vis memiliki akurasi yang baik untuk pengujian kadar alkaloid pada ekstrak daun asam jawa.

3.5.5 Presisi

Tujuan dari presisi adalah untuk mengetahui kedekatan hasil analisis bila dilakukan oleh analis yang sama pada waktu yang berbeda. Presisi dinyatakan sebagai persen deviasi standar relatif (% RSD) atau persen koefisien variasi [21]. Hasil pasti dari penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 4 Hasil Uji Akurasi

% Adisi	Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi Teoritis	% Recovery	Rata-Rata
45%	1	1,0826	12,922	12,04	107,32%	104,45%
	2	1,0634	12,663		105,17%	
	3	1,0250	12,145		100,87%	
60%	1	1,2160	14,720	13,30	110,67%	110,43%
	2	1,2126	14,674		110,33%	
	3	1,2123	14,670		110,30%	
80%	1	1,3239	16,174	14,90	108,55%	108,06%
	2	1,3131	16,028		107,57%	
	3	1,3185	16,101		108,06%	

Tabel 5 Hasil Uji Presisi

Konsentrasi	Replikasi	Absorbansi	Kadar (ppm)	Rerata (ppm)	Nilai SD	Nilai %RSD
45%	1	1,0826	12,922	12,66367	0,26816	2,117%
	2	1,0634	12,663			
	3	1,0250	12,145			
	4	1,0693	12,742			
	5	1,0718	12,776			
	6	1,0684	12,730			
60%	1	1,2160	14,720	14,71033	0,043001	0,292%
	2	1,2126	14,674			
	3	1,2123	14,670			
	4	1,2166	14,782			
	5	1,2168	14,731			
	6	1,2134	14,685			
80%	1	1,3239	16,174	16,19067	0,121944	0,753%
	2	1,3131	16,028			
	3	1,3185	16,101			
	4	1,3359	16,336			
	5	1,3243	16,179			
	6	1,3352	16,326			

Presisi merupakan ukuran kedekatan hasil pengujian pada pengulangan dengan prosedur yang sama [12]. Hasil perhitungan tabel diperoleh nilai simpangan baku relatif (RSD)

yaitu pada konsentrasi 45% yaitu 2,117%; konsentrasi 60% yaitu 0,292%; konsentrasi 80% yaitu 0,753%. Nilai RSD pada uji presisi ini memenuhi persyaratan [20] yaitu < 8%.

Semakin kecil nilai %RSD, maka ketepatan analisis suatu zat semakin baik untuk dilakukan. Dikatakan keterulangan yang baik dalam suatu analisis apabila penyimpangan yang terjadi masih dalam rentang yang diizinkan [9].

3.6 Penetapan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Daun Asam Jawa

Penentuan kadar alkaloid total pada penelitian ini dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 272,5 nm, metode penentuan kadar alkaloid total menggunakan larutan standar kafein, dimana standar kafein digunakan untuk menentukan total alkaloid. obat tanaman [22]. Metode ini didasarkan pada reaksi alkaloid dengan bromocresol green (BCG) dan membentuk larutan berwarna kuning. Untuk mengetahui kandungan alkaloid total ekstrak daun asam jawa dibuat dengan cara menambahkan HCl 2 N untuk menghilangkan senyawa alkaloid dari sampel ekstrak, karena alkaloid bersifat basa maka perlu ditambahkan asam seperti HCl sehingga membentuk garam kemudian ditambahkan fosfat. bumper pH 4,7 untuk menjaga pH dan penambahan BCG untuk membuat pH larutan menjadi basa, garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid. Tujuan penambahan BCG adalah agar garam alkaloid mengembalikan basa bebas alkaloid dan melepaskan alkaloid dari garamnya akibat penambahan asam tersebut. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan untuk mengekstrak kafein adalah kloroform karena kafein larut dengan baik dalam kloroform dan sifat kloroform yang mudah menguap membuatnya mudah dipisahkan dari ekstraknya [23]. Kurva kalibrasi standar untuk kafein menghasilkan persamaan regresi $y = 0,0742x + 0,1239$, dimana y adalah nilai serapan dan x adalah nilai konsentrasi. Hasil penelitian untuk mengetahui kadar total alkaloid ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Replikasi	Penimbangan (mg)	Absorbansi	Kadar (ppm)	Kadar (%b/b)
1	5,01	0,7355	8,2425 ppm	1,6447
2	5,03	0,7374	8,2681 ppm	1,6421
3	5,08	0,7475	8,4043 ppm	1,6535
		Rata-Rata		1,6467
		Standar Deviasi		0,0869

Berdasarkan hasil penelitian diketahui rata-rata kandungan alkaloid total ekstrak daun asam jawa yang diperoleh dengan metode refluks adalah $1,6467 \text{ b/b} \pm 0,0869$. Kandungan total alkaloid yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan kandungan total alkaloid pada [9] yaitu 4,1859% berat. Hal ini disebabkan karena ekstrak yang digunakan untuk mengetahui kadar alkaloid berbeda-beda dan cara yang digunakan juga berbeda. Penelitian ini menggunakan metode refluks, sedangkan metode ekstraksi yang digunakan pada [9] adalah metode perendaman, dan juga [9] menggunakan fraksi etil asetat, sedangkan penelitian ini menggunakan ekstrak.

Hasil dari penelitian yang sudah dilakukan terkait parameter validasi metode bahwa semua syarat validasi metode pada ekstrak daun asam jawa (*Tamarindus indica L.*) memenuhi syarat validasi metode. Dilakukan validasi metode dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis adalah untuk mengukur kadar alkaloid dalam daun asam jawa sesuai dengan parameter validasi agar lebih akurat dan spesifik [9].

4 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang sudah dilaksanakan diambil kesimpulan hasil penelitian menggunakan metode refluks menunjukkan adanya alkaloid dengan rata-rata kadar sebesar 2189 ppm. Hasil validasi metode analisis penentuan kandungan alkaloid total ekstrak daun asam jawa (*Tamarindus indica L.*) pada valid metode analisis terpenuhi kriteria menggunakan spektrofotometri UV-Vis, didapatkan hasil regresi linier dari uji linearitas. menjadi $y = 0,0742x + 0,1239$ dan koefisien korelasi (r) menjadi 0,9972; spesifisitas baik, batas deteksi (LOD) 0,0375 ppm dan batas kuantifikasi (LOQ) 0,1251 ppm, rata-rata hasil pengujian akurasi konsentrasi 45% adalah recovery rate = 104,45%, konsentrasi 60% adalah recovery kecepatan. = 110. 43% dan persen recovery 80% = 108.06%, sedangkan hasil uji presisi rata-rata untuk konsentrasi 45% adalah $SD = \pm 0.2681$ dan $\%RSD = 2.1175\%$, nilai SD untuk konsentrasi 60% = ± 0.0430 dan $\%RSD = 0.2923\%$ 80 % nilai SD konsentrasi = $\pm 0,1219$ dan $\%RSD = 0,7531\%$. Rerata kadar alkaloid total ekstrak daun asam jawa

(*Tamarindus indica* L.) adalah 1,6467% (b/b), SD = ±0,0869.

5 Pernyataan

5.1 Penyandang Dana

Penelitian ini tidak mendapatkan pendanaan dari sumber manapun.

5.2 Kontribusi Penulis

Semua penulis berkontribusi dalam penulisan artikel ini.

5.3 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

6 Daftar Pustaka

- [1] H. Hardiana, A. Adriani, dan F. Rahmadan, "Tumbuhan Obat, Desa Alue, Kabupaten Pidie. Gambaran Penggunaan Tumbuhan Obat Pada Masyarakat Desa Alue Kecamatan Pidie Kabupaten Pidie," *Jurnal Sains dan Kesehatan Darussalam*, vol. 1, no. 2, hlm. 29–37, 2021.
- [2] E. Yunita dan Z. Khodijah, "Pengaruh Konsentrasi Pelarut Etanol saat Maserasi terhadap Kadar Kuersetin Ekstrak Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) secara Spektrofotometri UV-Vis," *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, vol. 17, no. 2, hlm. 273–280, 2020.
- [3] R. Ningrum, "Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Batang Karamunting (*Rhodomirtus tomentosa*) Sebagai Bahan Ajar Biologi Untuk SMA Kelas X," University of Muhammadiyah Malang, 2015.
- [4] A. A. Kiswandono, "Skrining Senyawa Kimia Dan Pengaruh Metode Maserasi Dan Refluks Pada Biji Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) Terhadap Rendemen Ekstrak Yang Dihasilkan," *Sains Natural*, vol. 1, no. 2, hlm. 126, Nov 2017, doi: 10.31938/jsn.v1i2.21.
- [5] Y. Andhiarto, R. Andayani, dan N. H. Ilmiyah, "Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Daun Mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss.) Dengan Metode Ekstraksi Perkolasi Terhadap Pertumbuhan Bakteri," *Journal of Pharmacy Science and Technology*, vol. 2, no. 1, hlm. 102–111, 2020.
- [6] A. Fajrina, J. Jubahar, dan S. Sabirin, "Penetapan kadar tanin pada teh celup yang beredar dipasaran secara spektrofotometri uv-vis," *Jurnal Farmasi Higea*, vol. 8, no. 2, hlm. 133–142, 2017.
- [7] A. Rohman, U. G. M. Press, dan G. M. U. Press, *Validasi Penjaminan Mutu Metode Analisis Kimia*. UGM PRESS, 2018. [Daring]. Tersedia pada: <https://books.google.co.id/books?id=2IFYDwAAQBAJ>
- [8] Dewi Perwito Sari, *Buku Petunjuk Praktikum Fitokimia*. 2022.
- [9] A. D. Wardani, "Validasi Metode Dan Penentuan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (*Annona muricata* L.). Secara Spektrofotometri UV-VIS di Desa Kemiri Kabupaten Jember," UNIVERSITAS dr. SOEBANDI, 2022.
- [10] A. Y. Nasution, D. Mardhiyani, K. Putriani, D. Ananda, dan V. Saputro, "Perbandingan kadar vitamin c pada nanas segar dan keripik nenas dengan metode spektrofotometri uv-vis," *JOPS (Journal Of Pharmacy and Science)*, vol. 3, no. 1, hlm. 15–20, 2019.
- [11] B. F. Ayuni, "Validasi Metode Analisis Kafein pada Kopi Latte dengan Spektrofotometri UV-Vis," *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, vol. 7, no. 02, hlm. 155–164, 2022.
- [12] F. A. Aprilia, Y. Ayuliansari, T. Putri, M. Y. Azis, D. W. Camelina, dan R. M. Putra, "Analisis kandungan kafein dalam kopi tradisional gayo dan kopi lombok menggunakan HPLC dan spektrofotometri UV-Vis," *Biotika*, vol. 16, no. 2, hlm. 38–39, 2018.
- [13] S. Suharyanto dan A. D. R. S. Nasional, "Penetapan Kadar Flavonoid Total Jus Buah Delima (*Punica granatum* L.) Yang Berpotensi Sebagai Hepatoprotektor Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis".
- [14] N. Salamah, M. Rozak, dan M. Al Abror, "Pengaruh metode penyarian terhadap kadar alkaloid total daun jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa*. BL) dengan metode spektrofotometri visibel," *Pharmaciana*, vol. 7, no. 1, hlm. 113–122, 2017.
- [15] U. Santoso, W. Setyaningsih, A. Ningrum, A. Ardhi, dan U. G. M. Press, *Analisis Pangan*. UGM Press, 2021. [Daring]. Tersedia pada: <https://books.google.co.id/books?id=tSoSEAAQBAJ>
- [16] R. I. Depkes, "Undang-undang Republik Indonesia nomor 36 tahun 2009 tentang Kesehatan," *Sekretariat Negara RI*, 2009.
- [17] Riyanto, *Validasi & Verifikasi Metode Uji: Sesuai Dengan Iso/Iec17025 Laboratorium Pengujian Dan Kalibrasi*. Deepublish, 2016. [Daring]. Tersedia pada: <https://books.google.co.id/books?id=FZ3FDwAAQBAJ>
- [18] P. O. Samirana, "Isolasi Kafein Dengan Metode Sublimasi dari Fraksi Etil Asetat Serbuk Daun Teh Hitam (*Camelia sinensis*)," *Jurnal Farmasi Udayana*, vol. 7, no. 2, hlm. 53–62, 2018.

- [19] M. S. Rudi Kartika, *Verifikasi Dan Validasi Metode Uji Kualitas Udara*. Penerbit KBM Indonesia, 2022. [Daring]. Tersedia pada: <https://books.google.co.id/books?id=-yBZEAAAQBAJ>
- [20] B. V. McCleary, N. Sloane, A. Draga, dan I. Lazewska, "Measurement of total dietary fiber using AOAC Method 2009.01 (AACC International Approved Method 32-45.01): evaluation and updates," *Cereal Chemistry*, vol. 90, no. 4, hlm. 396-414, 2013.
- [21] H. Rivai, Y. M. Sianturi, dan R. Asra, "Pengembangan dan validasi metode analisis tablet simetidin dengan metode absorbansi dan metode luas daerah di bawah kurva secara spektrofotometri ultraviolet," *Jurnal Farmasi Higea*, vol. 8, no. 2, 2016.
- [22] N. Lisiyana, "Isolasi senyawa alkaloid fraksi etil asetat tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica L.*) dengan variasi kecepatan laju alir menggunakan kromatografi kolom," Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, 2016.
- [23] K. D. Daniati, "Optimasi dan Validasi Metode Analisis untuk Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Fraksi N-Heksan Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis," UNIVERSITAS dr. SOEBANDI, 2022.