

Identifikasi dan Kuantifikasi Asam Vanilat dan Skopoletin Ekstrak Etanol Daun Ginggang (*Leea aequata* L.) dengan Metode KCKT-FT

Purwaniati Purwaniati ^{a,1*}, Muhammad Ihsan Arhammudin ^{a,2}, Winasih Rachmawati ^{a,3}

^aAnalisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Jl. Soekarno-Hatta 754 Bandung (40614), Indonesia

¹purwaniati@bku.ac.id*; ²211ff03014@bku.ac.id; ³winasih.rachmawati@bku.ac.id

*korespondensi penulis

INFO ARTIKEL	ABSTRAK
Sejarah artikel: Diterima : 16-04-2026 Revisi : 26-04-2026 Dipublikasikan : 10-05-2026 Kata kunci : Asam vanilat Kuantifikasi Identifikasi KCKT-FT Skopoletin	Ginggang (<i>Leea aequata</i> L.) merupakan tanaman yang digunakan secara empirik untuk pengobatan maupun pengawetan produk pangan. Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode analisis kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik (KCKT-FT) untuk identifikasi dan kuantifikasi asam vanilat dan skopoletin dalam ekstrak etanol daun ginggang. Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol daun ginggang tanpa dekolorisasi (EE) dan ekstrak etanol daun ginggang yang telah didekolorisasi dengan karbon aktif serbuk (ED). Metode dikembangkan melalui optimasi kondisi kromatografi, uji kesesuaian sistem, dan validasi metode analisis. Hasil menunjukkan bahwa metode memenuhi kriteria validasi (spesifisitas, linearitas dengan $R^2 > 0,999$, presisi dengan %RSD < 2%, dan akurasi 85-88%). Kadar asam vanilat pada EE dan ED masing-masing adalah $0,0124 \pm 0,0010\%$ dan $0,0125 \pm 0,0012\%$, sedangkan kadar skopoletin meningkat dari $0,0099 \pm 0,0008\%$ (EE) menjadi $0,0189 \pm 0,0011\%$ (ED). Dekolorisasi menunjukkan adanya perubahan profil marker dalam ekstrak, berupa pemekatan kadar skopoletin. Metode KCKT-FT yang dikembangkan terbukti valid dan dapat digunakan untuk analisis asam vanilat dan skopoletin secara simultan.
Key word : Identification Quantification RP-HPLC Scopoletin Vanillic acid	ABSTRACT Ginggang (<i>Leea aequata</i> L.) is a plant used empirically in medicine and food preservation. This study aims to develop a reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) analytical method for the identification and quantification of vanillic acid and vanillic acid in the ethanol extract of ginggang leaves. The samples used were the ethanol extract of ginggang leaves without decolorization (EE) and the ethanol extract of ginggang leaves decolorized with powdered activated carbon (ED). The method was developed through optimization of chromatographic conditions, system suitability testing, and validation of the analytical method. The results showed that the method met the validation criteria (specificity, linearity with $R^2 > 0.999$, precision with %RSD < 2%, and accuracy of 85-88%). The levels of vanillic acid in EE and ED were $0.0124 \pm 0.0010\%$ and $0.0125 \pm 0.0012\%$, respectively, while the scopoletin levels increased from $0.0099 \pm 0.0008\%$ (EE) to $0.0189 \pm 0.0011\%$ (ED). Decolorization showed changes in the marker profile in the extract, in the form of a concentration of scopoletin levels. The developed RP-HPLC method was proven valid and can be used for the simultaneous analysis of vanillic acid and scopoletin. is an open-access article under the CC-BY-SA license.



Pendahuluan

Ginggang (*Leca aequata* L.) merupakan tumbuhan perdu dari famili vitacea. Tumbuhan ini dapat tumbuh hingga ketinggian 1,5 m. Tumbuhan ini memiliki batang berkayu dengan cabang bulat berwarna hijau, daun majemuk dengan anak daun berbentuk tombak. Spesies ini tersebar luas di Asia Selatan dan Asia Tenggara (Tun et al., 2019).

The World Flora Online (WFO) *Plant List* (WFO, 2025) menyatakan bahwa spesies ini memiliki sejumlah sinonim, yaitu: *Leca humilis*, *Leca scabra*, *Leca ancolana*, *Leca hirta*, *Leca hirsuta*, dan *Leca hispida*. Sedangkan diberbagai negara, spesies ini dikenal dengan nama lokalnya diantaranya: *kyu-patthein* (Myanmar) (Tun et al., 2019), *kakajangha*, *surapadi*, dan *velanasandi* (India dan Bangladesh) (IFO, 2025). Di Indonesia, tumbuhan ini dikenal dengan beberapa nama daerah, diantaranya: ginggang (Sunda), girang (Jawa), jirang (Madura), mali-mali (Makasar), uka (Maluku), daun tetanus (Sumatera) (Sinaga et al., 2018).

Ginggang merupakan tanaman yang secara empiris digunakan dalam pengobatan dan pengawetan pangan. Sejumlah penelitian melaporkan bahwa tanaman ini mengandung sejumlah metabolit sekunder seperti fenolik dan kumarin yang penting terhadap aktivitas biologisnya (Tun et al., 2019). Di antara senyawa-senyawa tersebut terdapat asam vanilat dan skopoletin yang dilaporkan memiliki sejumlah aktivitas seperti antimikroba dan antioksidan (Gao et al., 2024; Kenmeni et al., 2024). Oleh karena itu, kedua senyawa tersebut berpotensi digunakan sebagai marker untuk tujuan kontrol kualitas ekstrak daun ginggang (WHO, 2016).

Dalam pengembangan produk berbasis ekstrak tanaman, warna dan kadang aroma ekstrak yang kurang menyenangkan sering kali menjadi tantangan tersendiri (Dai & Mumper, 2010). Sehingga upaya dekolorisasi dan/atau deodorisasi sering dilakukan. Namun, upaya tersebut sering menyebabkan terjadinya perubahan komposisi senyawa di dalam ekstrak, sehingga juga berpotensi menyebabkan perubahan aktivitasnya (Liang et al., 2023a).

Hingga saat ini, belum ada metode analisis tervalidasi untuk identifikasi dan kuantifikasi asam vanilat dan skopoletin secara simultan dalam ekstrak etanol daun ginggang. Sehingga pengembangan metode analisisnya menjadi sebuah kebutuhan.

Berdasarkan kondisi tersebut, maka dilakukanlah penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode

kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik (KCKT-FT) untuk analisis simultan asam vanilat dan skopoletin dalam ekstrak etanol daun ginggang tanpa dekolorisasi dan yang didekolorisasi dengan menggunakan karbon aktif serbuk.

Metode

Alat dan Bahan

Alat-alat laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: alat-alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo), ultrasonic bath (Elma), kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu LC 20AD) dengan kolom 250 x 4,6 mm C18, *herb grinder*, *rotary evaporator* (IKA RV 10), oven (Binder WTB 9010-0333), *magnetic stirrer* (IKA C-MAG HS 7).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: etanol 96% Emprove® (I00971), baku skopoletin (COU-I-10, Markherb, Indonesia), baku asam vanilat (PHE-I6-100, Markherb, Indonesia), metanol pro HPLC (I.06007.4000, Jerman), *water for injection* (Ikapharmindo Putramas, Indonesia), asam format (I.00264.2500, Merck, Jerman), karbon aktif serbuk (KAS) (I.02186.1000, Merck, Jerman), *membrane filter* 0,22 mm (HAWPO4700, Merck, Jerman).

Pengumpulan bahan dan pembuatan simplisia

Sampel daun ginggang diperoleh dari Kecamatan Tambaksari, Kabupaten Ciamis, Indonesia. Sampel dipanen pada bulan Januari 2024. Sampel tanaman kemudian disortasi basah untuk memisahkan daun dari bagian tanaman lainnya dan pengotornya. Sampel daun kemudian dicuci dan dikeringkan dalam lemari pengering dengan suhu 40°C selama 4 hari, sehingga diperoleh daun kering (simplisia daun). Simplisia kemudian diserbukkan dengan bantuan *herb grinder* (Depkes RI, 2000).

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Di mana 1 kg serbuk simplisia direndam dengan 3×5 L etanol 96% dengan dilakukan pengadukan secara berkala. Penggantian pelarut dilakukan setiap 24 jam. Ekstrak yang diperoleh dikumpulkan dan disaring. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan bantuan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C hingga diperoleh bobot konstan (Depkes RI, 2000).

Dekolorisasi ekstrak

Ekstrak uji yang didekolorisasi dibuat dengan cara yang sama seperti pada tahap ekstraksi. Namun, setelah diperoleh ekstrak yang telah

disaring dengan kertas saring, ekstrak tersebut didekolorisasi dengan menggunakan karbon aktif serbuk (KAS) (Dai & Mumper, 2010; Liang et al., 2023a). Di mana setiap 100 mL ekstrak didekolorisasi dengan menambahkan 2 g KAS dan dilakukan pengadukan dengan bantuan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Ekstrak kemudian disaring untuk memisahkan ekstrak dari KAS. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan bantuan *rotary evaporator* hingga kental dan dilanjutkan dengan pengeringan dalam oven pada suhu 40 °C hingga diperoleh bobot konstan (Depkes RI, 2000).

Pembuatan larutan kerja

Larutan induk skopoletin dan asam vanilat dibuat terpisah, masing-masing dengan konsentrasi 1000 bpj, dengan pelarut metanol pro HPLC. Kemudian dibuat juga larutan baku skopoletin dan asam vanilat dengan konsentrasi 10 bpj dengan cara mengencerkan dari larutan induk. Kedua larutan baku tersebut digunakan dalam optimasi dan uji kesesuaian sistem KCKT.

Larutan baku campuran skopoletin dan asam vanilat kemudian dibuat dengan konsentrasi masing-masing 0,5; 1; 0,5; 2; 2,5; 3 dan 3,5 bpj. Larutan baku campuran ini kemudian digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi (ICH, 2024).

Optimasi dan uji kesesuaian sistem

Optimasi sistem KCKT dilakukan dengan menginjeksikan salah satu konsentrasi larutan baku campuran pada sistem KCKT yang telah diatur sebelumnya. Pengaturan sistem KCKT ini terutama pada pemilihan jenis fase gerak, perbandingan volume fase gerak, laju alir dan volume injeksi sampel. Sistem KCKT akan dianggap optimum bila kromatogram yang dihasilkan memenuhi semua kriteria berikut: 1). Nilai kapasitas kolom (k') berkisar antara 1–10; 2). Jumlah lempeng teoritis (N) lebih dari 2000; 3). Faktor pengekoran atau *tailing factor* (T_f) tidak lebih dari 1,5; dan 4). Resolusi (R_s) ≥ 2 (Kirkland, 1973).

Kesesuaian sistem dievaluasi dengan menginjeksikan larutan baku campuran sebanyak enam kali untuk menilai repeatabilitas sistem. Parameter yang diamati meliputi waktu retensi (R_t), luas puncak (AUC), faktor kapasitas (k'), jumlah lempeng teoritis (N), faktor pengekoran (*tailing factor*, T_f), dan resolusi (R_s). Sistem dinyatakan memenuhi kriteria kesesuaian apabila nilai persen *relative standard deviation* (%RSD) area dan waktu retensi $\leq 2\%$, serta parameter kromatografi (k' , N , T_f , dan R_s) berada dalam rentang yang dapat diterima (ICH, 2024).

Validasi metode analisis

Uji selektivitas

Selektivitas metode dievaluasi dengan membandingkan kromatogram larutan baku, sampel, dan sampel yang ditambahkan baku. Metode dinyatakan selektif apabila puncak analit terpisah dengan baik dari komponen lain tanpa adanya interferensi (ICH, 2024).

Uji linieritas

Uji linearitas dilakukan dengan menginjeksikan larutan baku campur pada beberapa tingkat konsentrasi (0,5–3,5 $\mu\text{g/mL}$). Hubungan antara konsentrasi dan respons (AUC) dievaluasi menggunakan regresi linier. Linearitas dinyatakan baik apabila koefisien korelasi (R^2) $\geq 0,99$ dan distribusi residual menunjukkan pola yang acak (ICH, 2024).

Uji batas deteksi dan batas kuantitasi

Uji sensitivitas dilakukan dengan menghitung nilai batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) berdasarkan standar deviasi respons dan kemiringan kurva kalibrasi (ICH, 2024).

Uji akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku pada sampel (*standard addition method*). Uji akurasi dilakukan baik pada ED maupun EE. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali, dan metode dianggap akurat apabila nilai persen perolehan kembali berada dalam rentang 80–120% (AOAC, 2002).

Penetapan kadar analit dalam sampel

Penetapan kadar asam vanilat dan skopoletin dilakukan pada EE maupun ED. Pada EE, 1 g EE dilarutkan dengan metanol hingga volumenya 100 mL. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL n-heksana. Campuran kemudian dikocok dan dibiarkan membentuk dua fase larutan. Fase n-heksana dipisahkan dan dibuang. Sedangkan fase metanol diuji lebih lanjut. 2,5 mL larutan fase metanol kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan metanol hingga tanda batas. Larutan kemudian disaring dengan membran *filter* 0,22 μm . Filtrat kemudian diinjeksikan ke KCKT.

Sedangkan pada ED, 500 mg ED dilarutkan dengan metanol hingga volumenya 50 mL. Larutan kemudian diencerkan dengan mengencerkan 2,5 mL larutan ED hingga volume akhirnya 5 mL (2x pengenceran). Larutan kemudian disaring dengan *membrane filter* 0,22 μm . Filtrat kemudian diinjeksikan ke KCKT.

Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi sampel dan rendemen

Sampel daun gingsiang yang digunakan dalam penelitian ini terbukti merupakan daun tanaman gingsiang (*Leea aequata* L.). Bukti ini ditunjukkan melalui hasil determinasi tanaman yang dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran, Bandung dengan No. 29/HB/03/2024.

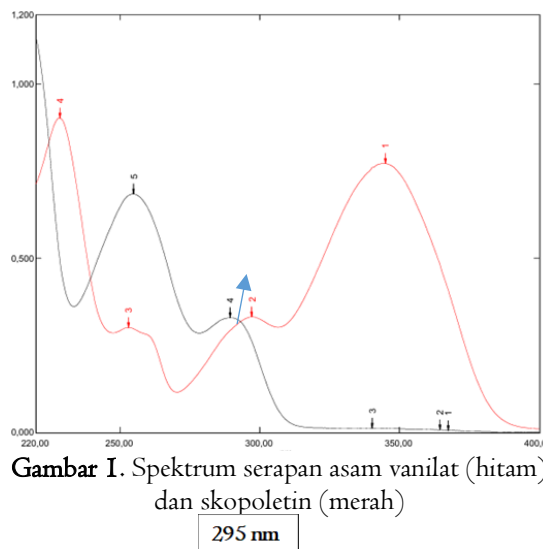
Determinasi tanaman, atau dikenal pula sebagai identifikasi botani, merupakan salah satu prosedur standar untuk mencegah kekeliruan spesies. Kekeliruan ini harus dicegah, karena dapat menyebabkan perbedaan komposisi metabolit sekunder dan aktivitas biologis tanaman tersebut (Soejarto et al., 2026; Upton et al., 2020).

Daun gingsiang segar mampu menghasilkan simplisia sebesar 12,5% dari bobot segarnya. Rendemen tersebut berada pada batas wajar, yaitu pada kisaran 10-20% dan menunjukkan pengeringan berlangsung dengan baik tanpa menyebabkan kehilangan kandungan kimianya secara signifikan (Depkes RI, 2000).

Simplisia kemudian menghasilkan rendemen EE dan ED berturut-turut 19,71 dan 13,63 %. Data rendemen ini memberikan gambaran umum bahwa daun gingsiang kaya akan senyawa yang larut dalam etanol, sehingga menghasilkan rendemen EE yang cukup besar. Rendemen ED yang lebih kecil mengindikasikan banyaknya komponen dalam ekstrak yang teradsorpsi oleh KAS (Chee et al., 2013; Liang et al., 2023a; Si et al., 2024). Senyawa-senyawa pigmen seperti klorofil merupakan senyawa yang paling banyak terjerap pada permukaan KAS tersebut (Ebrahimi et al., 2023; Liang et al., 2023).

Optimasi kondisi KCKT

Baku asam vanilat dan skopoletin dalam pelarut metanol memberikan panjang gelombang serapan maksimum yang berbeda. Asam vanilat memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 254 nm, sedangkan skopoletin pada 344 nm. Tumpang tindih kedua spektrum menunjukkan bahwa panjang gelombang 295 nm dapat dipilih sebagai panjang gelombang pengukuran kedua analit tersebut (Gambar 1).



Gambar 1. Spektrum serapan asam vanilat (hitam) dan skopoletin (merah)

Penggunaan panjang gelombang detektor 295 nm merupakan pilihan tepat, di mana analisis kedua analit dapat dilakukan pada satu panjang gelombang. Pendekatan seperti ini juga dilakukan dalam penelitian-penelitian sebelumnya. Sebagai contoh, campuran asam-asam fenolik dideteksi pada 280 nm (Cheng et al., 2022). Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian sebelumnya yang secara terpisah menganalisis skopoletin dan asam vanilat. Di mana skopoletin memberikan serapan maksimum pada sekitar 344 nm (Tan et al., 2020) dan asam vanilat pada 254 nm (González-Baró et al., 2008).

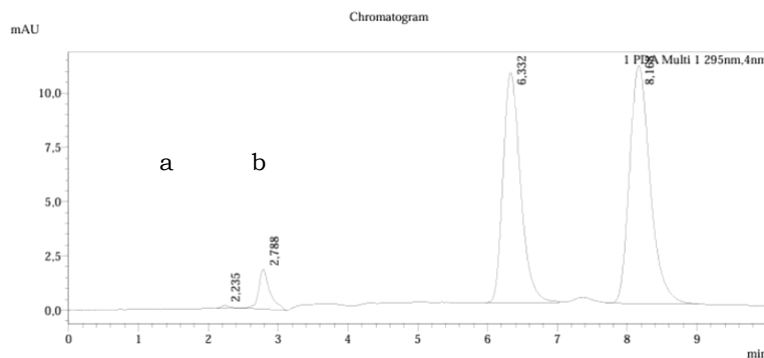
Sistem KCKT dengan fase diam $250 \times 4,6$ mm C_{18} , fase gerak asam format 1%: metanol (55:45) dengan detektor 295 nm memberikan hasil pengukuran analit yang paling baik. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit dan volume injeksi adalah 15 μ L. Kondisi ini memberikan pemisahan yang baik dengan $R_s \geq 2$, $T_f \leq 1,5$; $N > 2000$, serta k' berada dalam rentang yang sesuai. Data optimasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 1.

Kromatogram kedua analit disajikan pada **Gambar 2**. Data uji kesesuaian sistem asam vanilat dan skopoletin dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3. KCKT-FT, dengan kolom C_{18} , dipilih karena fase diam ini memang yang paling sesuai untuk analisis senyawa fenolik (asam vanilat) dan kumarin (skopoletin). Fase diam yang nonpolar relatif memberikan kemudahan dalam penggunaan/pemilihan fase geraknya (Susanti et al., 2024).

Tabel I. Kombinasi fase gerak dalam optimasi sistem KCKT

No	Analit	Fase Gerak	Rt	Tf <1,5	Rs >2	k' 1<k'<10	N >2000
1	AV	Air: metanol (50:50)	4,360	1,136	4,564	0,572	1973
	SP		6,242	1,694	4,494	1,251	4067
2	AV	Air: metanol (53:47)	5,153	1,187	4,494	0,849	2211
	SP		7,612	1,843	5,518	1,731	4521
3	AV	Air: metanol (55:45)	6,533	1,025	5,431	1,315	1037
	SP		8,090	1,890	2,380	1,867	4232
4	AV	Air: metanol: asetonitril (55:35:10)	5,197	1,709	5,440	0,974	1976
	SP		7,519	1,585	4,986	1,856	4208
5	AV	Air: metanol: asetonitril (55:30:15)	5,362	1,290	4,376	0,923	1307
	SP		6,984	1,437	2,956	1,505	3074
6	AV	Air: metanol: asetonitril (60:20:20)	5,941	1,031	5,013	1,330	1269
	SP		7,524	1,687	2,764	1,951	3972
7	AV	Asam asetat 0,1%: metanol (55:45)	6,587	2,028	12,132	1,316	4111
	SP		8,580	2,125	4,467	2,017	5077
8	AV	Asam asetat 0,1%: metanol: asetonitril (55:20:20)	5,374	2,028	4,194	1,040	3981
	SP		7,563	2,042	5,803	1,871	5347
9	AV	Asam format 1%: metanol (55:45)	6,293	1,298	9,658	1,820	3070
	SP		8,109	1,304	3,678	2,634	3699

Keterangan: AV= asam vanilat, SP= skopoletin, Rt= *retention time* (waktu retensi), Tf= *Tailing factor*, Rs= resolusi, k'= faktor kapasitas, N= jumlah plat teoritis



Gambar 2. Kromatogram asam vanilat (a) dan skopoletin (b)

Penggunaan asam format dalam fase gerak berperan dalam memperbaiki bentuk dan reproduktivitas puncak. Asam format encer ini akan mempertahankan analit dalam bentuk terprotonasi sehingga mengurangi pengekoran yang diakibatkan oleh interaksi ionik dengan silanol bebas pada fase diam (Dai & Mumper, 2010). Penambahan asam format akan menyebabkan penurunan pH fase gerak pada kisaran 2–3. pH rendah ini menyebabkan residu silanol berada dalam bentuk terprotonasi sehingga menurunkan kemampuannya sebagai situs pertukaran ion, sehingga interaksi silanol dengan analit menjadi minimal (Dai & Mumper, 2010; Goodlad, 2023). Studi terdahulu juga melaporkan bahwa perbaikan puncak ini dapat dicapai dengan penggunaan asam format atau asetat pada rentang 0,01-1% (Zhao et al., 2019). Kombinasi asam format dengan metanol sebagai fase gerak juga merupakan pilihan yang tepat. Metanol mampu memberikan pembersihan matriks yang optimal serta resolusi yang baik (Iglesias-Carres et al., 2019; Khoddami et al., 2013).

Validasi metode analisis

Selektivitas

Metode analisis memiliki selektivitas yang baik. Adisi sampel dengan baku menyebabkan peningkatan AUC pada waktu retensi spesifik, yaitu sekitar 6,2 – 6,4 menit untuk asam vanilat, dan 8,0 – 8,2 menit untuk skopoletin. Tidak ditemukan interferensi signifikan dari matriks, sehingga metode analisis dapat dinyatakan selektif untuk kedua analit (ICH, 2024; Patil & Joshi, 2015).

Linieritas

Kurva kalibrasi asam vanilat dan skopoletin dibuat dengan rentang konsentrasi yang sama, yaitu: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 dan 3,5 µg/mL. Persamaan regresi linier kurva kalibrasi asam vanilat adalah:

$y = 25611x - 2291,6$ dengan nilai $R^2 = 0,9997$, sedangkan persamaan regresi linier kurva kalibrasi skopoletin adalah: $y = 28093x - 2270,4$ dengan nilai $R^2 = 0,9998$.

Nilai koefisien korelasi skopoletin maupun asam vanilat $> 0,999$. Hal ini menunjukkan adanya

hubungan linieritas yang kuat antara konsentrasi analit dengan respons detektor (AUC) (FDA, 2018). Nilai tersebut mengindikasikan bahwa linearitas metode sangat baik dan memenuhi kriteria

validasi metode analisis menurut panduan *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (ICH, 2024).

Tabel 2. Data uji kesesuaian sistem asam vanilat

No	Rt (menit)	AUC	N >2000	Tf <1,5	Rs >2	k' (1 < k'<10)
1	6,246	183002	3097	1,306	9,639	1,796
2	6,261	183587	3075	1,300	9,612	1,809
3	6,293	182065	3074	1,298	9,658	1,820
4	6,332	185288	3065	1,319	9,696	1,833
5	6,360	183594	3066	1,313	9,779	1,846
6	6,379	182217	3064	1,288	9,831	1,857
Rata-rata ± SD	6,312±0,05	183292±1175,37	3074±12,47	1,304±0,85	9,703±0,08	1,827±0,022
RSD (%)	0,853	0,641	0,404	0,852	0,881	1,255

Keterangan: Rt= waktu retensi, AUC= *area under curve* (luas wilayah di bawah kurva), N= jumlah plat teoritis, Tf= *tailing factor*, Rs= resolusi, k'= faktor kapasitas

Tabel 3. Data uji kesesuaian sistem skopoletin

No	Rt (menit)	AUC	N >2000	Tf <1,5	Rs >2	k' (1 < k'<10)
1	8,031	224205	3730	1,302	3,664	2,596
2	8,058	223869	3733	1,298	3,669	2,615
3	8,109	223276	3699	1,304	3,678	2,634
4	8,168	225284	3707	1,291	3,693	2,655
5	8,210	224030	3712	1,298	3,704	2,674
6	8,238	224684	3704	1,304	3,709	2,690
Rata-rata ± SD	8,136±0,08	224225±692,521	3714±14,10	1,299±0,00	3,686±0,01	2,644±0,03
RSD (%)	1,024	0,308	0,379	0,382	0,505	1,351

Keterangan: Rt= waktu retensi, AUC= *area under curve* (luas wilayah di bawah kurva), N= jumlah plat teoritis, Tf= *tailing factor*, Rs= resolusi, k'= faktor kapasitas

Koefisien korelasi memang merupakan parameter yang paling lazim digunakan dalam penentuan linieritas, namun penggunaan parameter ini saja dapat menyesatkan (Janse et al., 2021). Pemeriksaan baku residual (S_y/x) juga perlu dilakukan, di mana semakin kecil nilai ini mencerminkan semakin kecilnya kesalahan acak suatu metode. Nilai S_x/y yang kecil selanjutnya berpengaruh pada nilai V_{x0} yang juga kecil. Nilai V_{x0} pada kedua kurva kalibrasi adalah 1,41% untuk asam vanilat dan 1,35% untuk skopoletin. Nilai V_{x0} kedua kurva kalibrasi tersebut kurang dari 2%, sehingga dapat dinyatakan bahwa kurva kalibrasi tersebut memiliki kualitas yang baik (ICH, 2024). V_{x0} atau varians konsentrasi hasil prediksi merupakan nilai yang menyatakan varians (ketidakpastian) konsentrasi analit yang dihitung dari persamaan regresi (ISO, 1993; Yunita et al., 2020).

Selain itu, kurva kalibrasi juga memiliki slope yang relatif tinggi, sedangkan intersepnya relatif rendah pada kedua analit. Nilai slope yang tinggi menunjukkan bahwa metode analisis memiliki sensitivitas yang baik. Dan sebaliknya, nilai intersep yang rendah menunjukkan kontribusi kesalahan sistemik yang minimal (Miller & Miller, 2010).

Batas deteksi dan batas kuantitasi

Metode analisis mampu mendeteksi analit hingga konsentrasi yang rendah, yaitu sekitar 0,08 $\mu\text{g/mL}$, dan dapat mengkuantifikasi mulai konsentrasi sekitar 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4). Nilai BD dan BK tersebut menunjukkan bahwa metode analisis ini mampu mendeteksi dan mengkuantifikasi analit dalam jumlah kecil secara andal (ICH, 2024).

Tabel 4. Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi metode

Parameter ($\mu\text{g/mL}$)	Skopoletin	Asam Vanilat
BD	0,0814	0,0843
BK	0,2713	0,2812

Akurasi

Uji akurasi merupakan uji yang mengukur kemampuan metode analisis untuk memberikan hasil pengukuran yang mendekati nilai sebenarnya. Akurasi dinyatakan dengan persentase perolehan kembali. Nilai persen perolehan kembali yang semakin mendekati 100% mengindikasikan akurasi metode yang semakin baik. Data % perolehan kembali yang diujikan pada konsentrasi 2; 2,5; dan

3 $\mu\text{g/mL}$ baik pada asam vanilat maupun skopoletin menghasilkan nilai % perolehan kembali berturut-turut $85,71 \pm 1,04$ dan $87,92 \pm 0,78\%$ (Tabel 5 dan 6). Nilai % perolehan kembali tersebut mengindikasikan bahwa metode analisis ini akurat untuk kedua analit, karena memberikan nilai % perolehan kembali pada rentang 80-120% (AOAC, 2002).

Akurasi pada pengujian ini masih rendah, yaitu hanya sekitar 85% (asam vanilat) dan 88% (skopoletin). Meskipun nilai tersebut masih dapat diterima (AOAC, 2002; FDA, 2019; Phungsiangdee et al., 2023). Pada penelitian berikutnya perlu dilakukan optimasi preparasi sampel, sehingga diperoleh akurasi yang lebih baik.

Tabel 5. Hasil uji akurasi pada asam vanilat

Konsentrasi Teoritis ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi Hasil Analisis ($\mu\text{g/mL}$)	% Perolehan kembali	Rata-rata $\pm$ SD
2	1,71	85,94	$85,71 \pm 1,04$
	1,74	87,35,	
	1,77	88,66	
2,5	2,15	86,06	
	2,14	85,66	
	2,09	83,84	
3	2,53	84,45	
	2,52	84,11	
	2,55	85,28	

Tabel 6. Hasil uji akurasi pada skopoletin

Konsentrasi Teoritis ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi Hasil Analisis ($\mu\text{g/mL}$)	% Perolehan kembali	Rata-rata $\pm$ SD
2	1,77	88,53	$87,92 \pm 0,78$
	1,75	87,82	
	1,80	90,19	
2,5	2,07	83,15	
	2,08	83,40	
	2,11	84,48	
3	2,75	91,67	
	2,73	91,31	
	2,62	90,76	

Presisi

Presisi merupakan ukuran kedekatan antara serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran. Uji presisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah presisi *intraday* dan *interday*. Presisi ditetapkan dengan nilai %RSD. Metode analisis yang digunakan untuk menganalisis sampel dengan matriks yang kompleks seperti pada ekstrak uji ini mensyaratkan nilai RSD tidak lebih dari 5% (ICH, 2024). Data uji presisi ini dengan metode sampel adisi menunjukkan bahwa %RSD asam vanilat sebesar 1,39% dan

skopoletin sebesar 1,31%. Data tersebut menunjukkan bahwa metode analisis ini presisi untuk analisis asam vanilat dan skopoletin dalam ekstrak daun ginggang.

Penetapan kadar dalam sampel

Penetapan kadar asam vanilat dan skopoletin dilakukan pada sistem KCKT yang telah divalidasi. Perhitungan kadarnya juga memperhitungkan nilai % akurasi. Kadar asam vanilat dan skopoletin pada EE dan DE terlihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Kadar asam vanilat dan skopoletin pada ekstrak tanpa dekolorisasi dan dengan dekolorisasi

Sampel	Kadar (%)	
	Asam vanilat	Skopoletin
Ekstrak tanpa dekolorisasi	0,0124±0,0010	0,0099±0,0008
Ekstrak dengan dekolorisasi	0,0125±0,0012	0,0189±0,0011

Kadar asam vanilat relatif stabil antara ekstrak yang didekolorisasi maupun tidak didekolorisasi. Sedangkan kadar skopoletin meningkat secara nyata. Perbedaan ini dapat dijelaskan dengan berbagai dugaan.

Dugaan pertama, dekolorisasi mengurangi massa total ekstrak dengan mengadsorpsi pigmen-pigmen dalam ekstrak (Dai & Mumper, 2010; Dayrell et al., 2022; Liang et al., 2023b). Kondisi tersebut menyebabkan fraksi yang tidak teradsorpsi meningkat secara persentase, walaupun jumlah mutlakny tidak berubah. Dalam hal ini terjadi efek pemekatan. Fenomena ini terlihat jelas pada peningkatan kadar skopoletin setelah didekolorisasi. Sedangkan pada asam vanilat, tidak terjadi peningkatan kadar. Hal ini dapat terjadi karena senyawa fenolik seperti asam vanilat juga dapat teradsorpsi pada permukaan karbon aktif. Sehingga sebagian asam vanilat juga terbuang. Studi terdahulu menyatakan bahwa penggunaan karbon aktif dalam menyebabkan kehilangan senyawa total fenolik hingga 81% (Chee et al., 2013; Dai & Mumper, 2010).

Dugaan kedua, dekolorisasi akan menyebabkan hilangnya sejumlah pengganggu dalam analisis asam vanilat dan skopoletin. Sehingga memperjelas puncak analit dan menghasilkan pengukuran yang lebih akurat dan kadar terukur menjadi lebih besar, meskipun jumlah mutlak analit dalam sampel adalah tetap (Aung et al., 2023; Dayrell et al., 2022; Scheepers et al., 2011; Steiner et al., 2020)

Penelitian ini telah memberikan landasan yang baik dalam pengembangan metode analisis asam vanilat dan skopoletin pada ekstrak etanol daun ginggang. Namun, penelitian ini masih memerlukan penyempurnaan pengembangan metode lebih lanjut. Pengembangan sebaiknya ditekankan pada aspek preparasi sampel dan pemilihan alternatif adsorben selain karbon aktif, yaitu adsorben yang tidak mengadsorpsi kedua analit.

Simpulan dan Saran

Metode KCKT yang dikembangkan telah memenuhi parameter validasi meliputi selektivitas, linearitas, presisi, dan akurasi, sehingga dapat

digunakan untuk penetapan kadar asam vanilat dan skopoletin dalam ekstrak etanol daun ginggang. Dekolorisasi menggunakan karbon aktif tidak mempengaruhi kadar asam vanilat secara signifikan, namun meningkatkan kadar skopoletin terukur, yang menunjukkan adanya perubahan profil senyawa akibat penghilangan komponen matriks. Hasil ini menegaskan bahwa proses dekolorisasi dapat mempengaruhi kuantifikasi senyawa marker dalam ekstrak. Penelitian ini memberikan pendekatan baru dalam analisis simultan senyawa marker serta mengevaluasi pengaruh proses dekolorisasi terhadap profil kimia ekstrak daun ginggang.

Penelitian selanjutnya disarankan untuk mengevaluasi pengaruh dekolorisasi terhadap senyawa bioaktif lain dalam ekstrak serta mengkaji hubungan perubahan komposisi kimia dengan aktivitas biologisnya.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian kepada Masyarakat (DRPM) Universitas Bhakti Kencana yang telah mendanai penelitian ini melalui skema riset dasar internal Universitas Bhakti Kencana tahun 2025.

Daftar Pustaka

- AOAC. (2002). AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. <https://doi.org/10.1063/1.4915424>
- Aung, W. W., Panich, K., Watthanophas, S., Naridsirikul, S., Ponphaiboon, J., Krongrawa, W., Kulpicheswanich, P., Limmatvapirat, S., & Limmatvapirat, C. (2023). Preparation of Bioactive De-Chlorophyll Rhein-Rich Senna alata Extract. *Antibiotics*, *12*(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010181>
- Chee, T. L., Abdul Gaffar, R., Abdul Majid, F. A., & Sarmidi, M. R. (2013). Herbal extract decolourization device using activated carbon. *Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)*, *61*(1), 73–79. <https://doi.org/10.11113/jt.v61.1626>

- Cheng, J., Zhou, C., Xie, Y., Wang, M., Zhou, C., Li, X. S., Du, Y. D., & Lu, F. (2022). A new method for simultaneous determination of 14 phenolic acids in agricultural soils by multiwavelength HPLC-PDA analysis. *RSC Advances*, *12*(23), 14939–14944. <https://doi.org/10.1039/d1ra09433e>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dayrell, R. L. C., Cawthray, G. R., Lambers, H., & Ranathunge, K. (2022). Using activated charcoal to remove substances interfering with the colorimetric assay of inorganic phosphate in plant extracts. *Plant and Soil*, *476*(1–2), 755–764. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05195-2>
- Depkes RI. (2000). Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. *Direktorat Jenderal POM*. <https://doi.org/10.1201/b12934-13>
- Ebrahimi, P., Shokramraji, Z., Tavakkoli, S., Mihaylova, D., & Lante, A. (2023). Chlorophylls as Natural Bioactive Compounds Existing in Food By-Products: A Critical Review. *Plants*, *12*(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/plants12071533>
- FDA. (2018). Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation*, May.
- FDA. (2019). Criteria end guidance for the validation of chemical methods. *Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products*, 23. <https://fda.report/media/121751/ValidationNucleicAcidSequenceBasedAnalysisFoodFeedCosmeticsVeterinary.pdf>
- Gao, X. Y., Li, X. Y., Zhang, C. Y., & Bai, C. Y. (2024). Scopoletin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity. *Frontiers in Pharmacology*, *15*(February), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1268464>
- González-Baró, A. C., Parajón-Costa, B. S., Franca, C. A., & Pis-Diez, R. (2008). Theoretical and spectroscopic study of vanillic acid. *Journal of Molecular Structure*, *889*(1–3), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.01.049>
- Goodlad, M. (2023). *Reversed-phase-for-biomolecules: From column selection to troubleshooting*.
- ICH. (2024). Validation of analytical procedures – ICH Q2(R2). *European Pharmaceutical Review*, *29*(1), 5.
- IFO. (2025). India Flora Online, Indian Institute of Science. In *India Flora Online*. Indian Institute of Science. <https://indiafloraces.iisc.ac.in/index.php>
- Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Bravo, F. I., Bladé, C., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2019). Optimization of extraction methods for characterization of phenolic compounds in apricot fruit (: *Prunus armeniaca*). *Food and Function*, *10*(10), 6492–6502. <https://doi.org/10.1039/c9fo00353c>
- ISO. (1993). *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*.
- Janse, R. J., Hoekstra, T., Jager, K. J., Zoccali, C., Tripepi, G., Dekker, F. W., & Diepen, M. Van. (2021). Conducting correlation analysis: important limitations and pitfalls. *Clinical Kidney Journal*, *14*(10), 0–5. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfab085>
- Kenmeni, J. F., Sif, I., Bisso, B. N., Kayoka-kabongo, P. N., Jo, U., & Dzoyem, J. P. (2024). *Exploring Medicinal Plants for Antimicrobial Activity and Synergistic Effects With Doxycycline Against Bacterial Species. 2024*.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kirkland, L. R. S. J. J. (1973). *Introduction to Modern Liquid Chromatography Introduction to Modern Liquid Chromatography Second Edition*.
- Liang, D., Ji, B., Wang, Y., Li, X., & Gao, W. Y. (2023a). Effect of activated carbon microstructure and adsorption mechanism on the efficient removal of chlorophyll a and chlorophyll b from *Andrographis paniculata* extract. *Scientific Reports*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42011-6>
- Liang, D., Ji, B. yu, Wang, Y., Li, X., & Gao, W. Y. (2023b). Effect of activated carbon microstructure and adsorption mechanism on the efficient removal of chlorophyll a and chlorophyll b from *Andrographis paniculata*

- extract. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42011-6>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*.
- Patil, J. R., & Joshi, D. G. (2015). Various criteria in development & validation of HPLC analytical methods: -Review. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, *6*(4), 91–99.
- Phungsangdee, Y., Chaothong, P., Karnpanit, W., & Tanaviyutpakdee, P. (2023). Validation of UHPLC-ESI-MS/MS Method for Determining Steviol Glycoside and Its Derivatives in Foods and Beverages. *Foods*, *12*(21). <https://doi.org/10.3390/foods12213941>
- Scheepers, J. C., Malan, S. F., du Preez, J. L., & van Dyk, S. (2011). The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of ultraviolet (UV) irradiated chlorophyll a and secondary plant compounds. *African Journal of Biotechnology*, *10*(74), 16976–16985. <https://doi.org/10.5897/ajb11.1999>
- Si, X., Li, J., Zhao, T., Cao, W., & Qiao, C. (2024). Effective Decolorization of Poly-γ-Glutamic Acid Fermentation Broth by Integrated Activated Carbon Adsorption and Isoelectric Point Precipitation of Glutamic Acid. *Molecules*, *29*(23). <https://doi.org/10.3390/molecules29235769>
- Sinaga, E., Ginting, N., & Suwarso, E. (2018). Uji Aktivitas Antikejang Ekstrak Etanol Daun Titanus (Leea Aequata L.) Terhadap Ileum Marmut Terpisah (Cavia Porcellus) Secara In Vitro. *Talanta Conference Series: Tropical Medicine (TM)*, *1*(1), 320–330. <https://doi.org/10.32734/tm.v1i1.66>
- Soejarto, D. D., Addo, E. M., & Kinghorn, A. D. (2026). The continuing need for taxonomic input in phytochemical research. *Journal of Ethnopharmacology*, *354*(April 2025), 120474. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.120474>
- Steiner, D., Krska, R., Malachová, A., Taschl, I., & Sulyok, M. (2020). Evaluation of Matrix Effects and Extraction Efficiencies of LC-MS/MS Methods as the Essential Part for Proper Validation of Multiclass Contaminants in Complex Feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(12), 3868–3880. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07706>
- Susanti, I., Pratiwi, R., Rosandi, Y., & Hasanah, A. N. (2024). Separation Methods of Phenolic Compounds from Plant Extract as Antioxidant Agents Candidate. *Plants*, *13*(7), 1–38. <https://doi.org/10.3390/plants13070965>
- Tan, D. C., Quek, A., Kassim, N. K., Ismail, I. S., & Lee, J. J. (2020). Rapid quantification and validation of biomarker scopoletin in *Paederia foetida* by qNMR and UV–Vis for herbal preparation. *Molecules*, *25*(21), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules25215162>
- Tun, N. L., Hu, D. B., Xia, M. Y., Zhang, D. D., Yang, J., Oo, T. N., Wang, Y. H., & Yang, X. F. (2019). Chemical Constituents from Ethanolic Extracts of the Aerial Parts of *Leea aequata* L., a Traditional Folk Medicine of Myanmar. *Natural Products and Bioprospecting*, *9*(3), 243–249. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0209-y>
- Upton, R., David, B., Gafner, S., & Glasl, S. (2020). Botanical ingredient identification and quality assessment: strengths and limitations of analytical techniques. *Phytochemistry Reviews*, *19*(5), 1157–1177. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09625-z>
- WFO. (2025). *WFO Plant List, Snapshots of the Taxonomy*. <https://wfoplantlist.org/>
- WHO. (2016). *Annex I WHO guidelines for selecting marker substances of herbal*.
- 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>
- Zhao, D., Yuan, B., Carry, E., Pasinetti, G. M., Ho, L., Faith, J., Mogno, I., Simon, J., Wu, Q., Agriculture, U., Plant, N., Program, P., Sciences, B., Brunswick, N., Peters, J. J., Affairs, V., & Sciences, G. (2019). *Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry method for analyzing microbial-derived grape polyphenol metabolites*. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.014>.Development

