Indo. J. Chem. Sci. 15 (3) (2026)

Indonesian Journal of Chemical Science

http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs

Isolation Green Analytical Chemistry-Based UV-Vis Microplate Method for Efficient Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents in *Centella asiatica* Leaf Extract

Martin Sulistyani[1]✉, Woro Sumarni[2], Widhi Mahatmanti[1], Nuril Huda[1], Ridho Prasetyo[1,3]

[1]Prodi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati, Semarang 50229
[2]Prodi Magister Pendidikan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati, Semarang 50229
[3]Prodi Magister Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Kec. Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah 50275

Info Artikel

Diterima: 27-08-2026

Disetujui: 24-09-2026

Dipublikasikan: 13-11-2026

Keywords:
Green Analytical Chemistry; UV-Vis microplate; total phenolic content; total flavonoid content; Centella asiatica

Abstract

Conventional UV-Vis spectrophotometric determination of total phenolics and flavonoids generally requires relatively large sample and reagent volumes. This study developed and evaluated the analytical performance of a UV-Vis microplate method for determining total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) in the ethanol extract of Centella asiatica leaves, in line with Green Analytical Chemistry principles. TPC was determined using the Folin–Ciocalteu method with gallic acid as the standard, while TFC was determined using the $AlCl_3$ colorimetric method with quercetin as the standard. Analytical performance was evaluated based on maximum wavelength, linearity, repeatability, and agreement with nominal standard concentrations. The method showed linear responses over the 10–100 µg/mL range, with R^2 values of 0.99744 for gallic acid and 0.99951 for quercetin. Repeatability showed %RSD values below 2% using five technical replicates. Agreement with nominal concentrations ranged from 99.143–99.778% for gallic acid and 99.364–99.871% for quercetin. The extract yielded TPC of 350.417 ± 1.67 mg GAE/g and TFC of 78.246 ± 1.314 mg QE/g. Reaction volumes were 200 µL for TPC and 110 µL for TFC, with analysis times of 20 and 15 min, respectively. The method demonstrated efficient use of samples and reagents through miniaturization and potential waste reduction.

Abstrak

Penentuan total fenolik dan flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis konvensional umumnya memerlukan volume sampel dan reagen yang relatif besar sehingga meningkatkan konsumsi bahan dan potensi timbulan limbah. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan mengevaluasi kinerja analitik metode UV-Vis *microplate* untuk penentuan total fenolik (TPC) dan total flavonoid (TFC) pada ekstrak etanol daun *Centella asiatica* berdasarkan prinsip *Green Analytical Chemistry*. TPC ditentukan menggunakan metode Folin–Ciocalteu dengan asam galat sebagai standar, sedangkan TFC ditentukan menggunakan metode kolorimetri $AlCl_3$ dengan quercetin sebagai standar. Kinerja analitik dievaluasi berdasarkan panjang gelombang maksimum, linearitas, *repeatability*, dan kesesuaian dengan konsentrasi standar nominal. Metode menunjukkan respons linier pada rentang 10–100 µg/mL, dengan R^2 sebesar 0,99744 untuk asam galat dan 0,99951 untuk quercetin. *Repeatability* menghasilkan %RSD < 2% dengan 5 replikasi teknis. Kesesuaian terhadap konsentrasi nominal standar masing-masing sebesar 99,143–99,778% untuk asam galat dan 99,364–99,871% untuk quercetin. Ekstrak menghasilkan TPC sebesar 350,417 ± 1,67 mg GAE/g dan TFC sebesar 78,246 ± 1,314 mg QE/g. Volume reaksi masing-masing 200 dan 110 µL dengan waktu analisis 20 dan 15 menit. Metode ini menunjukkan efisiensi penggunaan sampel dan reagen melalui miniaturisasi serta berpotensi mengurangi volume limbah.

© 2026 Universitas Negeri Semarang

✉ Correspondence address:
Gedung D6 Lantai 2 Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229
E-mail: martin@mail.unnes.ac.i

p-ISSN 2252-6951
e-ISSN 2502-6844

Pendahuluan

Flavonoid dan senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder penting pada tanaman yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan serta berbagai efek biologis yang bermanfaat bagi kesehatan. Oleh karena itu, kuantifikasi kedua kelompok senyawa tersebut memiliki peranan penting dalam penelitian bahan alam serta pengembangan dan pengendalian mutu produk pangan, farmasi, dan nutraseutikal (Worsfold & Zagatto, 2017). Spektrofotometri UV-Vis banyak digunakan untuk penetapan kandungan total flavonoid (*Total Flavonoid Content*, TFC) dan total fenolik (*Total Phenolic Content*, TPC) karena prosedurnya sederhana, cepat, dan relatif ekonomis. Penetapan TPC umumnya menggunakan reaksi Folin–Ciocalteu yang menghasilkan kromofor berwarna biru, sedangkan TFC ditentukan melalui pembentukan kompleks dengan $AlCl_3$ yang menghasilkan respons pada daerah 410–430 nm (Lawag et al., 2023; Ramos et al., 2017). Ketersediaan metode analisis yang andal untuk karakterisasi senyawa bioaktif tersebut juga mendukung Sustainable Development Goal (SDG) 3 (*Good Health and Well-being*), khususnya dalam penelitian dan pengembangan produk berbasis bahan alam.

Meskipun memiliki keunggulan dari sisi kesederhanaan dan biaya, spektrofotometri UV-Vis konvensional berbasis kuvet umumnya menggunakan sampel dan reagen dalam volume mililiter. Kondisi tersebut menyebabkan konsumsi bahan kimia dan pembentukan limbah cair relatif tinggi. Selain itu, pengukuran konvensional umumnya dilakukan secara berurutan sehingga membatasi *throughput* analisis ketika jumlah sampel meningkat (Liu et al., 2026). Keterbatasan tersebut menunjukkan perlunya pengembangan metode analisis yang tidak hanya mempertahankan kinerja analitik, tetapi juga mampu meningkatkan efisiensi penggunaan sumber daya serta produktivitas laboratorium. Pengembangan teknologi analitik yang lebih efisien tersebut sejalan dengan SDG 9 (*Industry, Innovation and Infrastructure*), terutama dalam memperkuat inovasi dan infrastruktur penelitian.

Spektrofotometri UV-Vis berbasis *microplate* menawarkan alternatif melalui miniaturisasi sistem reaksi dan kemampuan untuk mengukur beberapa sampel secara simultan. Penggunaan *microplate* 96-*well* atau 384-*well* memungkinkan analisis dilakukan dengan volume sampel dan reagen yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan sistem kuvet. Penelitian pendahuluan yang dilakukan peneliti selama 2023–2025 menunjukkan bahwa sistem UV-Vis *microplate* mampu menghasilkan linearitas yang tinggi ($R^2 > 0,99$) dan presisi yang baik (%RSD < 2%) (Martin Sulistyani et al., 2025). Pengujian awal juga menunjukkan bahwa penggunaan volume reaksi ≤200 µL dapat menurunkan konsumsi reagen secara signifikan dibandingkan dengan metode berbasis kuvet. Temuan tersebut menunjukkan potensi sistem *microplate* untuk dikembangkan sebagai pendekatan analisis yang lebih efisien dan berorientasi pada keberlanjutan.

Dalam perspektif *Green Analytical Chemistry* (GAC), efisiensi metode analitik tidak hanya ditentukan oleh validitas dan keandalan hasil, tetapi juga oleh dampak lingkungan dari keseluruhan proses analisis, termasuk penggunaan sampel dan reagen, pembentukan limbah, waktu analisis, serta *throughput*. Miniaturisasi merupakan salah satu strategi penting dalam GAC karena dapat mengurangi penggunaan bahan dan limbah sejak sumbernya (Sari et al., 2023). Meskipun teknologi UV-Vis *microplate* telah dikenal memiliki kemampuan *high-throughput* dan menggunakan volume reaksi mikro, penerapannya untuk analisis TPC dan TFC masih banyak berfokus pada optimasi teknis dan belum secara sistematis mengintegrasikan validasi kinerja analitik dengan evaluasi efisiensi sumber daya. Oleh karena itu, diperlukan kajian yang menghubungkan keandalan metode dengan indikator efisiensi yang terukur, seperti volume sampel, volume reaksi, konsumsi reagen, waktu analisis, dan potensi pembentukan limbah.

Penelitian ini mengembangkan dan memEvaluasi kinerja analitik UV-Vis *microplate* untuk penentuan TPC dan TFC pada ekstrak daun *Centella asiatica* sekaligus mengevaluasi kontribusinya terhadap penerapan prinsip GAC. Kinerja analitik metode dievaluasi melalui parameter linearitas, presisi, dan *agreement*, sedangkan aspek keberlanjutan dianalisis berdasarkan kebutuhan sampel, volume total reaksi, waktu analisis, dan potensi pengurangan limbah dibandingkan dengan prosedur UV-Vis konvensional yang dilaporkan dalam literatur. Metode yang dikembangkan menggunakan volume total reaksi sebesar 200 µL untuk analisis TPC dan 110 µL untuk analisis TFC, sehingga memberikan dasar kuantitatif untuk mengevaluasi efisiensi penggunaan sumber daya. Hasil penelitian selanjutnya dikaitkan dengan kontribusinya terhadap SDG 3, SDG 9, dan SDG 12 (*Responsible Consumption and Production*).

Dengan mengintegrasikan Evaluasi kinerja analitik dan evaluasi berbasis GAC, penelitian ini tidak hanya bertujuan menghasilkan metode analisis TPC dan TFC yang andal, tetapi juga menunjukkan bahwa spektrofotometri UV-Vis *microplate* dapat dikembangkan sebagai pendekatan analitik yang lebih hemat sampel dan reagen, sehingga mengurangi limbah, memperpendek waktu analisis, serta mendukung praktik laboratorium yang berkelanjutan. Pendekatan tersebut diharapkan dapat menjadi model penerapan analisis senyawa bioaktif yang menggabungkan kinerja analitik dengan efisiensi sumber daya dalam kerangka laboratorium yang berkelanjutan.

Metode

Alat dan Bahan

Bahan kimia yang digunakan meliputi asam galat pro analysis (p.a.) sebagai standar untuk analisis fenolik total (TPC), quercetin pro analysis (p.a.) sebagai standar untuk analisis flavonoid total (TFC), reagen Folin–Ciocalteu, natrium karbonat (Na_2CO_3), aluminium klorida ($AlCl_3$), akuades, dan etanol 96%, yang diperoleh dari Merck. Ekstrak daun *Centella asiatica* digunakan sebagai sampel. Instrumen utama yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis microplate Fluostar Omega BMG LabTech dengan 96-well quartz microplate. Preparasi ekstrak dilakukan menggunakan rotary evaporator Eyela, sedangkan penimbangan dilakukan menggunakan neraca analitik Ohaus. Mikropipet digunakan untuk pengukuran volume pada skala mikroliter.

Preparasi ekstraks *Centella asiatica*

Serbuk daun *C. asiatica* diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% pada perbandingan sampel terhadap pelarut 1:10 selama 3 hari. Proses ekstraksi dilakukan dalam kondisi terlindung dari cahaya dan campuran diaduk setiap 24 jam. Setelah maserasi, campuran disaring dan filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C, tekanan 140 mmHg, dan kecepatan putaran 25 rpm. Ekstrak yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk analisis.

Preparasi Larutan Standar

Larutan standar asam galat dan quercetin disiapkan sebagai larutan induk, kemudian diencerkan untuk memperoleh larutan standar dalam rentang konsentrasi 10–100 μg/mL. Masing-masing konsentrasi digunakan untuk membangun kurva kalibrasi TPC dan TFC.

Penentuan Total Fenolik (TPC)

Kandungan fenolik total (TPC) ditentukan menggunakan metode Folin–Ciocalteu. Sebanyak 12 μL larutan standar atau sampel dimasukkan ke dalam well, kemudian ditambahkan 50 μL akuades dan 13 μL reagen Folin–Ciocalteu. Campuran diinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan 125 μL larutan Na_2CO_3 7% dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Dengan demikian, total waktu inkubasi/reaksi adalah 20 menit. Selanjutnya, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis microplate pada panjang gelombang 746 nm, yang ditentukan berdasarkan hasil pemindaian spektrum. Total volume reaksi adalah 200 μL. Kandungan fenolik total dinyatakan sebagai mg GAE/g ekstrak.

Penentuan Flavonoid Total (TFC)

TFC ditentukan menggunakan metode kolorimetri $AlCl_3$. Sebanyak 100 μL larutan standar quercetin atau sampel dicampurkan dengan 10 μL $AlCl_3$, kemudian diinkubasi selama 15 menit. Total volume reaksi adalah 110 μL. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis *microplate* pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari hasil pemindaian. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai mg QE/g ekstrak.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan memindai larutan standar pada rentang 400–800 nm. Pengukuran dilakukan menggunakan *microplate* dan spektrum absorbansi direkam untuk menentukan panjang gelombang dengan respons maksimum. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh kemudian digunakan untuk pengukuran kuantitatif TPC dan TFC.

Evaluasi Kinerja Analitik Metode UV-Vis *microplate*

Kinerja metode dievaluasi melalui parameter linearitas, presisi, dan *agreement*. Linearitas ditentukan berdasarkan hubungan antara konsentrasi standar dan absorbansi menggunakan analisis regresi linier. Parameter yang dievaluasi meliputi persamaan regresi, *slope*, *intercept*, *Pearson's correlation coefficient*, R^2, dan *adjusted* R^2. Keterulangan dievaluasi dengan melakukan pengukuran berulang terhadap masing-masing larutan standar dan sampel pada kondisi analisis yang sama. Setiap larutan standar dan sampel diukur sebanyak lima kali (n = 5) pada sumur (*well*) yang berbeda dalam *microplate* yang sama. Pengulangan tersebut merupakan replikasi teknis karena menggunakan larutan standar atau sampel yang sama tanpa melakukan preparasi sampel secara independen. Hasil pengukuran dinyatakan sebagai nilai rata-rata, simpangan baku (SD), dan simpangan baku relatif (%RSD).

Presisi ditentukan melalui pengukuran berulang (*repeatability*) pada kondisi analisis yang sama. Presisi dinyatakan sebagai %RSD yang dihitung menggunakan:

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} x\ 100\% \ldots\ldots (1)$$

Dengan SD adalah simpangan baku dan adalah nilai rata-rata hasil pengukuran. Kriteria keberterimaan presisi yang digunakan dalam penelitian ini adalah %RSD ≤ 2%.

% agreement ditentukan dengan membandingkan konsentrasi hasil pengukuran terhadap konsentrasi teoritis dan dinyatakan sebagai persentase *agreement*:

$$\%\ Agreement = \frac{C_{terukur}}{C_{teoritis}}\ x\ 100\% \ldots\ldots (2)$$

Evaluasi *Green Analytical Chemistry*

Kontribusi metode terhadap *Green Analytical Chemistry* dievaluasi berdasarkan beberapa indikator efisiensi, meliputi volume sampel, volume total reaksi, waktu analisis, dan potensi pembentukan limbah kimia. Kinerja metode *microplate* dibandingkan dengan prosedur spektrofotometri konvensional berbasis kuvet yang telah dilaporkan dalam literatur. Metode yang dikembangkan menggunakan volume total reaksi sebesar 200 µL untuk TPC dan 110 µL untuk TFC, sehingga memungkinkan evaluasi kuantitatif terhadap pengurangan penggunaan bahan dan limbah.

Analisis Data

Konsentrasi analit dalam sampel dihitung berdasarkan persamaan regresi linier:

$$Y = bx + a \ldots\ldots (3)$$

Dengan absorbansi, konsentrasi analit, *slope*, dan *intercept*. Konsentrasi yang diperoleh dari persamaan kalibrasi selanjutnya digunakan untuk menentukan kandungan TPC dan TFC dalam ekstrak dan dinyatakan masing-masing sebagai mg GAE/g ekstrak dan mg QE/g ekstrak

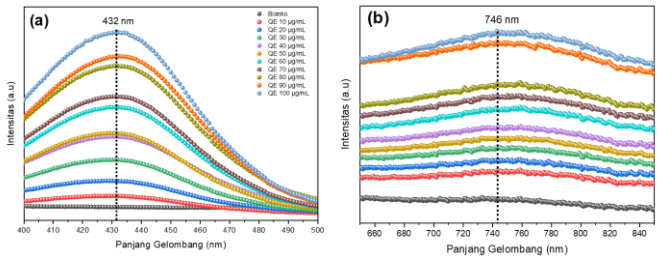
Hasil dan Pembahasan

Evaluasi kinerja analitik UV-Vis Microplate

Evaluasi kinerja analitik merupakan tahap penting untuk memastikan bahwa metode analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis *microplate* mampu menghasilkan data yang andal dan sesuai untuk penetapan kandungan total fenolik dan total flavonoid (Sosa-España et al., 2026). Pada penelitian ini, validasi dilakukan menggunakan asam galat dan quercetin sebagai standar dengan mengevaluasi parameter analitik meliputi panjang gelombang maksimum, linearitas, presisi, dan *agreement*. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis *microplate* Fluostar Omega BMG LabTech dengan *microplate* 96-*well* melalui sistem reaksi berskala mikroliter. Hasil pengujian terhadap parameter-parameter tersebut selanjutnya digunakan untuk menilai kinerja analitik metode serta memastikan kesesuaiannya untuk analisis senyawa bioaktif. Selain aspek analitik, evaluasi kinerja analitik menjadi dasar dalam mengevaluasi penerapan sistem *microplate* sebagai pendekatan *Green Analytical Chemistry* karena penggunaan volume reaksi yang lebih kecil berpotensi meningkatkan efisiensi penggunaan sampel dan reagen serta mengurangi limbah kimia yang dihasilkan selama proses analisis (Sajid & Płotka-Wasylka, 2025).

Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk memperoleh kondisi pengukuran yang memberikan respons absorbansi paling optimal pada analisis total flavonoid dan total fenolik menggunakan UV-Vis *microplate*.



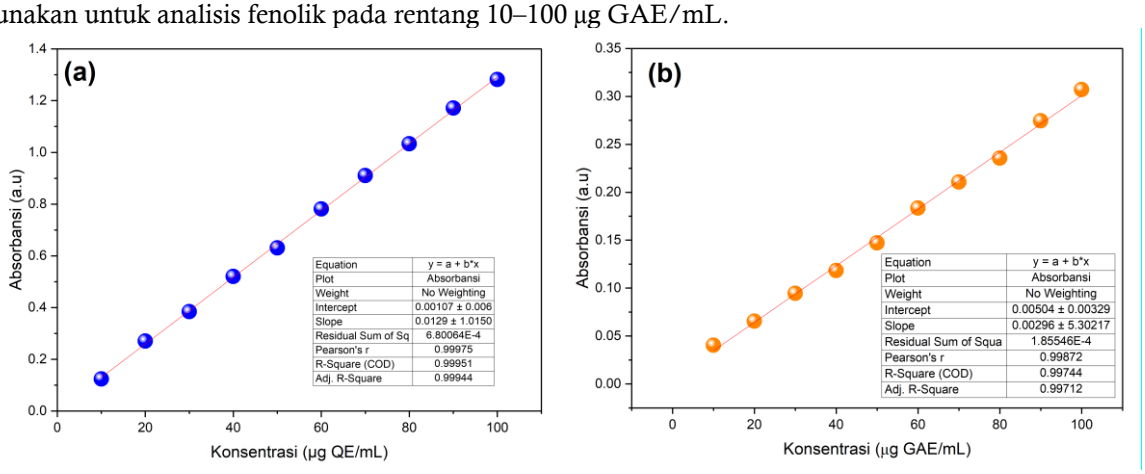
Gambar 1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (a) Flavonoid dan (b) Fenolik

Berdasarkan **Gambar 1(a),** spektrum larutan standar quercetin menunjukkan peningkatan intensitas serapan seiring meningkatnya konsentrasi standar dan menghasilkan puncak serapan maksimum pada 432 nm. Posisi puncak yang relatif konsisten pada berbagai konsentrasi menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi terutama memengaruhi intensitas serapan, sedangkan karakteristik spektralnya tetap berada pada daerah panjang gelombang yang sama (Wu & Zhang, 2014). Kondisi ini menunjukkan respons spektrofotometri yang sesuai untuk digunakan dalam analisis kuantitatif flavonoid. Panjang gelombang 432 nm selanjutnya ditetapkan sebagai panjang gelombang analisis total flavonoid karena memberikan respons maksimum dan diharapkan menghasilkan sensitivitas pengukuran yang lebih baik (Sharma et al., 2025).

Pada **Gambar 1(b),** larutan standar asam galat yang direaksikan dengan reagen Folin–Ciocalteu menunjukkan pola spektrum dengan puncak serapan maksimum pada 746 nm. Seperti halnya pada pengukuran flavonoid, peningkatan konsentrasi standar menghasilkan peningkatan intensitas serapan, sementara posisi maksimum relatif tetap. Puncak pada 746 nm menunjukkan terbentuknya spesies berwarna hasil reaksi senyawa fenolik dengan reagen Folin–Ciocalteu yang memberikan respons pada daerah tampak (Khursheed et al., 2024). Panjang gelombang 746 nm kemudian dipilih sebagai kondisi pengukuran total fenolik karena memberikan respons maksimum pada sistem reaksi yang digunakan. Konsistensi posisi puncak pada berbagai konsentrasi juga menjadi indikasi awal bahwa kondisi pengukuran yang dipilih dapat digunakan untuk tahap evaluasi linearitas dan presisi metode (Hiranpradith et al., 2025). Secara keseluruhan, hasil penentuan panjang gelombang maksimum menunjukkan bahwa metode UV-Vis *microplate* mampu menghasilkan spektrum yang jelas untuk kedua analit dengan λmaks masing-masing 432 nm untuk flavonoid dan 746 nm untuk fenolik. Peningkatan intensitas serapan yang mengikuti kenaikan konsentrasi standar menunjukkan bahwa kedua sistem analisis memiliki respons terhadap konsentrasi yang dapat dimanfaatkan untuk membangun kurva kalibrasi.

Linearitas Kurva Standar

Linearitas merupakan parameter Evaluasi kinerja analitik yang digunakan untuk menunjukkan kemampuan metode dalam menghasilkan respons analitik yang proporsional terhadap perubahan konsentrasi analit (Jurado et al., 2017). Pada penelitian ini, linearitas dievaluasi melalui hubungan antara konsentrasi standar dan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis *microplate*. Standar quercetin digunakan untuk analisis flavonoid pada rentang 10–100 µg QE/mL, sedangkan standar asam galat digunakan untuk analisis fenolik pada rentang 10–100 µg GAE/mL.



Gambar 2. Kurva Standar (a) Flavonoid, dan (b) Fenolik

Tabel 1. Perbandingan Parameter Linearitas Standar Quercetin dan Asam Galat

Parameter	Standar Quercetin	Standar Asam Galat
Persamaan regresi	y = 0,0129 + 0,00107x	y = 0,00296 + 0,00504x
Slope	0,0129 ± 1,0150	0,00296 ± 5,30217
Intercept	0,00107± 0,006	0,00504 ± 0,00329
Pearson's r	0,99975	0,99872
R^2	0,99951	0,99744
Adjusted R^2	0,99944	0,99712

Berdasarkan **Gambar 2(a),** peningkatan konsentrasi quercetin menghasilkan peningkatan absorbansi secara linier dengan persamaan y = 0,0129 + 0,00107x. Nilai *slope* sebesar 0,0129 ± 1,0150 dan

intercept sebesar 0,00107 ± 0,006, dengan *Pearson's r* = 0,99975, R^2 = 0,99951, dan *adjusted* R^2 = 0,99944. Nilai R^2 menunjukkan bahwa 99,951% variasi respons absorbansi dijelaskan oleh perubahan konsentrasi quercetin, sedangkan nilai *Pearson's r* yang mendekati 1 menunjukkan hubungan linier yang sangat kuat (Aslami et al., 2026). Nilai *slope* positif menunjukkan respons absorbansi meningkat secara proporsional terhadap konsentrasi, sementara *intercept* yang kecil menunjukkan kontribusi respons dasar yang rendah (Li et al., 2022).

Pada **Gambar 2(b),** standar asam galat menunjukkan hubungan linier pada rentang 10–100 µg GAE/mL dengan persamaan y = 0,00296 + 0,00504x. Nilai *slope* sebesar 0,00296 ± 5,30217 dan *intercept* sebesar 0,00504 ± 0,00329, dengan *Pearson's r* = 0,99872, R^2 = 0,99744, dan *adjusted* R^2 = 0,99712. Nilai R^2 menunjukkan bahwa 99,793% variasi absorbansi dijelaskan oleh perubahan konsentrasi asam galat, sehingga persamaan regresi dapat digunakan untuk kuantifikasi analit pada sampel. Secara keseluruhan, kedua kurva menunjukkan linearitas yang sangat baik dengan R^2 > 0,997 pada rentang 10–100 µg/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa sistem UV-Vis *microplate* mampu memberikan respons yang proporsional terhadap konsentrasi standar. Linearitas yang tinggi, bersama dengan hasil presisi yang menunjukkan %RSD < 2%, mendukung penggunaan rentang tersebut sebagai rentang kerja untuk analisis kuantitatif flavonoid dan senyawa fenolik.

Pengujian Presisi (*Repeatability*)

Presisi metode ditentukan melalui pengukuran berulang (*repeatability*) larutan standar pada kondisi analisis yang sama. Parameter presisi dievaluasi berdasarkan nilai simpangan baku (*standard deviation*, SD) dan *simpangan baku relatif* (%RSD). Nilai SD menunjukkan besarnya penyebaran hasil pengukuran terhadap nilai rata-rata, sedangkan %RSD menunjukkan besarnya variasi hasil pengukuran secara relatif (Ezenarro et al., 2026). Semakin kecil nilai SD dan %RSD, semakin tinggi tingkat keterulangan pengukuran. Berdasarkan **Tabel 2,** hasil pengukuran standar flavonoid dan fenolik menunjukkan nilai %RSD yang rendah pada seluruh tingkat konsentrasi yang diuji.

Tabel 2. Hasil Pengujian Presisi (*Repeatability*) Standar Flavonoid dan Fenolik Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Microplate

Flavonoid					**Fenolik**				
Konsentrasi (µg QE/mL)	Rata-rata	Abs-Blanko	SD	RSD (%)	Konsentrasi (µg GAE/mL)	Average	Abs-blank	SD	RSD (%)
0	0,033	0,000	0,000	0,000	0	0,138	0,000	0,000	0,000
10	0,157	0,124	0,001	0,534	10	0,179	0,040	0,001	0,468
20	0,303	0,270	0,001	0,330	20	0,204	0,066	0,002	1,150
30	0,417	0,384	0,001	0,313	30	0,233	0,095	0,002	0,679
40	0,553	0,520	0,003	0,485	40	0,257	0,118	0,003	1,081
50	0,663	0,631	0,002	0,229	50	0,286	0,147	0,001	0,399
60	0,814	0,781	0,003	0,313	60	0,322	0,184	0,001	0,220
70	0,943	0,911	0,002	0,159	70	0,349	0,211	0,004	1,199
80	1,066	1,033	0,004	0,401	80	0,374	0,236	0,002	0,655
90	1,204	1,172	0,003	0,272	90	0,413	0,275	0,003	0,766
100	1,314	1,282	0,003	0,226	100	0,446	0,307	0,003	0,563

Data disajikan sebagai rata-rata ± SD; n = 5 replikasi teknis yang diukur pada well yang berbeda dalam microplate yang sama.

Pada standar flavonoid, nilai SD berada pada rentang 0,001–0,004 dengan %RSD sebesar 0,159–1,680%. Nilai tertinggi diperoleh pada konsentrasi 0 µg QE/mL (1,680%), sedangkan nilai terendah pada konsentrasi 70 µg QE/mL (0,159%). Pada konsentrasi 10–100 µg QE/mL, seluruh nilai %RSD berada di bawah 1%, menunjukkan keterulangan pengukuran yang baik serta variasi antarulangan yang rendah. Pada standar fenolik, nilai SD berada pada rentang 0,001–0,004 dengan %RSD sebesar 0,220–1,199%. Nilai terendah diperoleh pada 60 µg GAE/mL (0,220%) dan nilai tertinggi pada 70 µg GAE/mL (1,199%). Seluruh

konsentrasi 10–100 µg GAE/mL menunjukkan %RSD < 1,2%, yang menunjukkan keterulangan pengukuran yang baik.

Secara keseluruhan, seluruh nilai %RSD berada di bawah 2%, sehingga memenuhi kriteria keberterimaan presisi yang digunakan dalam penelitian. Nilai SD dan %RSD yang rendah menunjukkan bahwa variasi akibat preparasi, pemipetan, pembentukan kompleks, dan pembacaan absorbansi dapat dikendalikan dengan baik (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020). Hasil ini juga menunjukkan bahwa penggunaan *microplate* dengan volume reaksi skala mikroliter tetap mampu menghasilkan pengukuran yang konsisten. Dengan demikian, metode UV-Vis *microplate* memiliki presisi yang baik dan mendukung kelanjutan evaluasi parameter validasi serta penetapan kandungan total flavonoid dan fenolik pada sampel.

Kesesuaian terhadap Konsentrasi Nominal Standar

Kesesuaian antara konsentrasi hasil pengukuran dan konsentrasi nominal standar dievaluasi untuk mengetahui kemampuan sistem UV-Vis microplate dalam menghasilkan respons kuantitatif yang konsisten terhadap larutan standar pada kondisi analisis yang digunakan. Evaluasi dilakukan pada tiga tingkat konsentrasi, yaitu 30, 50, dan 70 µg/mL, menggunakan quercetin sebagai standar pada analisis flavonoid dan asam galat sebagai standar pada analisis fenolik. Masing-masing sampel dilakukan penulangan pembacaan sebanyak 5 kali. Konsentrasi hasil pengukuran dihitung berdasarkan persamaan regresi masing-masing kurva kalibrasi, kemudian dibandingkan dengan konsentrasi nominal yang digunakan dalam preparasi standar.

Tabel 3. Kesesuaian Konsentrasi Terukur dan Konsentrasi Nominal Standar Quercetin

Konsentrasi (µg QE/mL)	Rata-Rata	Abs-Blanko	SD	RSD	Konsentrasi terukur (µg QE/mL)	Agreement (%)
30	0,420	0,388	0,001	0,199	29,961	99,871
50	0,675	0,642	0,002	0,289	49,682	99,364
70	0,934	0,902	0,003	0,317	69,822	99,745

Tabel 4. Kesesuaian Konsentrasi Terukur dan Konsentrasi Nominal Standar Asam Galat

Konsentrasi (µg GAE/mL)	Rata-rata	Abs-blanko	SD	RSD (%)	Konsentrasi terukur (µg GAE/mL)	agreement (%)
30	0,233	0,095	0,001	0,559	29,933	99,778
50	0,293	0,154	0,001	0,390	49,733	99,467
70	0,352	0,213	0,001	0,156	69,400	99,143

Data disajikan sebagai rata-rata ± SD; n = 5 replikasi teknis yang diukur pada well yang berbeda dalam microplate yang sama

Berdasarkan **Tabel 3**, konsentrasi quercetin yang terukur pada konsentrasi nominal 30, 50, dan 70 µg/mL masing-masing sebesar 29,961; 49,682; dan 69,822 µg/mL. Nilai tersebut masing-masing setara dengan 99,871%; 99,364%; dan 99,745% dari konsentrasi nominal. Nilai simpangan baku berada pada rentang 0,001–0,003 dengan %RSD sebesar 0,199–0,317%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa respons sistem analisis memberikan kesesuaian yang tinggi terhadap konsentrasi nominal larutan standar quercetin dalam rentang konsentrasi yang diuji (Jacksier & Weterings, 2017). Pada standar asam galat, konsentrasi terukur pada konsentrasi nominal 30, 50, dan 70 µg/mL masing-masing sebesar 29,933; 49,733; dan 69,400 µg/mL (**Tabel 4**). Kesesuaian terhadap konsentrasi nominal masing-masing sebesar 99,778%; 99,467%; dan 99,143%, dengan nilai %RSD sebesar 0,156–0,559%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pengukuran larutan standar asam galat menghasilkan respons yang konsisten dan mendekati konsentrasi nominal pada kondisi analisis yang digunakan.

Meskipun demikian, hasil tersebut perlu diinterpretasikan dengan saksama. Pengujian dilakukan menggunakan larutan standar quercetin dan asam galat, bukan melalui penambahan standar (*spiking*) ke dalam matriks ekstrak *Centella asiatica*. Oleh karena itu, nilai kesesuaian sebesar >99% untuk quercetin dan asam galat tidak diinterpretasikan sebagai *matrix recovery*. Nilai tersebut terutama menunjukkan kesesuaian antara konsentrasi yang dihitung berdasarkan persamaan kalibrasi dan konsentrasi nominal larutan standar yang digunakan dalam kondisi pengukuran (Sari et al., 2023).

Penggunaan larutan standar yang sama atau berasal dari sistem standar yang digunakan untuk membangun kurva kalibrasi juga dapat menyebabkan hasil konsentrasi terukur mendekati nilai nominal melalui proses *back-calculation*. Dengan demikian, hasil ini tidak dapat digunakan secara mandiri untuk membuktikan *agreement* metode pada matriks *Centella asiatica*. Evaluasi *recovery* berbasis matriks melalui eksperimen *spike-recovery* diperlukan untuk mengetahui pengaruh matriks ekstrak terhadap hasil pengukuran. Dengan demikian, pada penelitian ini hasil pengujian standar digunakan sebagai evaluasi kesesuaian terhadap konsentrasi nominal standar, bukan sebagai bukti *recovery* pada matriks sampel. Keterbatasan ini perlu dipertimbangkan dalam interpretasi kinerja analitik metode UV-Vis microplate yang dikembangkan.

Hasil analisis kandungan fenolik dan flavonoid sampel

Penetapan kandungan total flavonoid (*Total Flavonoid Content*, TFC) dan total fenolik (*Total Phenolic Content*, TPC) dilakukan untuk mengetahui potensi senyawa bioaktif dalam ekstrak daun *Centella asiatica* menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada *microplate*. Hasil pada **Tabel 5** menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *C. asiatica* pada penelitian ini memiliki TFC sebesar 78,246 ± 1,314 mg QE/g ekstrak dan TPC sebesar 350,417 ± 1,67 mg GAE/g ekstrak. Nilai TFC dinyatakan sebagai ekuivalen quercetin (QE), sedangkan TPC dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat (GAE).

Kandungan fenolik dan flavonoid *C. asiatica* menunjukkan variasi antarpenelitian yang dipengaruhi oleh bagian tanaman dan kondisi ekstraksi, terutama jenis dan polaritas pelarut **(Tabel 5)**. Perbedaan profil antarbagian tanaman menunjukkan bahwa distribusi metabolit sekunder tidak seragam pada jaringan tanaman. Hasil penelitian ini masih berada dalam kisaran yang dilaporkan pada berbagai ekstrak *C. asiatica*, dengan variasi yang dapat disebabkan oleh perbedaan pelarut, rasio bahan terhadap pelarut, teknik ekstraksi, serta kondisi proses (Eff et al., 2025; Sharma et al., 2025).

Tabel 5. Kandungan Total Flavonoid dan Total Senyawa Fenolik Ekstrak Pegagan (Centella asiatica L.)

Ekstrak	TFC (mg QE/g ekstrak)	TPC (mg GAE/g ekstrak)	Referensi
C. asiatica ekstrak aseton 70%	3,0533 ± 0,1069	13,883 ± 0,050	(Hossain et al., 2024)
Daun *C. asiatica* – ekstrak heksana	9,10 ± 0,30	2,67 ± 0,83	(Sharma et al., 2025)
Batang *C. asiatica* – ekstrak metanol	11,05 ± 0,50	29,52 ± 1,03	(Sharma et al., 2025)
Daun *C. asiatica* – ekstrak metanol	19,76 ± 1,12	43,73 ± 0,33	(Sharma et al., 2025)
Ekstrak heksana *C. asiatica*	70,01 ± 0,50	45,75 ± 0,77	(Eff et al., 2025)
Ekstrak etil asetat *C. asiatica*	50,46 ± 0,53	49,60 ± 2,33	(Eff et al., 2025)
Ekstrak *C. asiatica* hasil optimasi UAE	43,71 ± 1,92	52,29 ± 1,65	(Hiranpradith et al., 2025)
Batang *C. asiatica* – ekstrak heksana	2,76 ± 0,10	6,20 ± 0,76	(Sharma et al., 2025)
Ekstrak etanol *C. asiatica*	51,95 ± 0,74	61,03 ± 3,44	(Eff et al., 2025)
Ekstrak butanol *C. asiatica*	72,95 ± 1,28	76,78 ± 3,44	(Eff et al., 2025)
Daun *C. asiatica* – ekstrak etanol	**78,246 ± 1,314**	**350,417 ± 1,67**	**Penelitian ini**

Penggunaan etanol sebagai pelarut pada penelitian ini memungkinkan ekstraksi senyawa fenolik dan flavonoid yang memiliki polaritas sesuai dengan sifat pelarut tersebut. Selain itu, perbedaan bagian tanaman juga dapat menyebabkan variasi komposisi metabolit sekunder, sehingga hasil dari daun tidak selalu dapat dibandingkan secara langsung dengan hasil dari batang atau bagian tanaman lainnya. Dengan demikian, ekstrak etanol daun *C. asiatica* pada penelitian ini menunjukkan kandungan total flavonoid dan terutama total fenolik yang tinggi dibandingkan dengan nilai pembanding yang tercantum pada **Tabel 5**. Hasil tersebut sekaligus menunjukkan bahwa metode UV-Vis *microplate* yang telah menunjukkan linearitas, presisi, dan *agreement* yang baik dapat diterapkan untuk penetapan senyawa bioaktif pada sampel ekstrak pegagan. Kandungan TFC dan TPC yang diperoleh selanjutnya dapat digunakan sebagai dasar untuk mengkaji hubungan antara kandungan senyawa bioaktif dan aktivitas biologis ekstrak pada tahap penelitian berikutnya.

Efisiensi dan Kontribusi *Green Analytical Chemistry*

Penerapan prinsip *Green Analytical Chemistry* pada penelitian ini terutama ditunjukkan melalui miniaturisasi volume reaksi, pengurangan konsumsi sampel dan reagen, pengurangan limbah, serta pemendekan waktu analisis (Sari et al., 2023). Pada analisis fenolik, metode yang dikembangkan menggunakan volume total reaksi hanya 200 µL, sedangkan metode konvensional pada penelitian terdahulu menggunakan sekitar 3.000–10.000 µL **(Tabel 6)**. Dengan demikian, sistem *microplate* memungkinkan analisis dilakukan pada skala mikroliter sehingga kebutuhan bahan kimia dan volume larutan yang berpotensi menjadi limbah dapat diminimalkan.

Efisiensi penggunaan sampel juga terlihat jelas. Analisis fenolik pada penelitian ini hanya membutuhkan 12 µL sampel, sedangkan metode pembanding menggunakan 300–500 µL. Pada analisis flavonoid, kebutuhan sampel sebesar 100 µL, dibandingkan dengan 250 µL hingga 1.500 µL pada metode terdahulu. Pengurangan volume sampel tersebut menunjukkan bahwa miniaturisasi tidak hanya mengurangi konsumsi reagen, tetapi juga memungkinkan analisis dilakukan dengan menggunakan jumlah ekstrak yang lebih kecil. Dari aspek waktu, analisis fenolik pada penelitian ini memerlukan sekitar 25 menit, sedangkan metode pembanding memerlukan 40–60 menit. Analisis flavonoid bahkan hanya memerlukan 15 menit, dibandingkan dengan sekitar 30 menit pada metode sebelumnya. Pemendekan waktu reaksi tersebut meningkatkan efisiensi proses analisis dan berpotensi meningkatkan *throughput* pengukuran ketika menggunakan *microplate* yang memungkinkan beberapa sampel dianalisis secara simultan.

Tabel 6. Perbandingan Kondisi Analisis dan Efisiensi Metode Penentuan TFC dan TPC Ekstrak Centella asiatica

Sampel/Referensi	Parameter	Volume sampel (µL)	Volume total reaksi (µL)	Total Inkubasi / waktu Reaksi (menit)	λ (nm)	Sistem analisis	Kontribusi GAC
C. asiatica ekstrak heksana / (Eff et al., 2025)	Fenolik	500	10.000	60	740	UV-Vis konvensional	Konsumsi sampel dan reagen relatif tinggi
	Flavonoid	1.500	5.000	30	425	UV-Vis konvensional	Konsumsi sampel dan pelarut relatif tinggi
C. asiatica hasil optimasi UAE / (Hiranpradith et al., 2025)	Fenolik	300	3.000	40	765	UV-Vis konvensional	Pengurangan volume reaksi
	Flavonoid	250	2.500	30	420	UV-Vis konvensional	Pengurangan konsumsi sampel dan reagen
Penelitian ini	**Fenolik**	**12**	**200**	**20**	**746**	**UV-Vis *microplate***	**Miniaturisasi dan pengurangan sampel, reagen, waktu, dan limbah**
Penelitian ini	**Flavonoid**	**100**	**110**	**15**	**432**	**UV-Vis *microplate***	**Miniaturisasi dan efisiensi sampel, reagen, waktu, dan limbah**

Pengurangan volume reaksi dari skala mililiter menjadi ratusan mikroliter juga secara langsung berkontribusi pada pencegahan terbentuknya limbah kimia. Pada penelitian ini, volume total reaksi fenolik hanya 200 µL dan volume flavonoid 110 µL. Dengan demikian, jumlah larutan sisa setelah analisis dapat ditekan secara signifikan dibandingkan dengan metode konvensional. Pendekatan ini selaras dengan prinsip GAC yang menekankan pencegahan limbah pada sumbernya melalui pengurangan penggunaan bahan dan miniaturisasi proses analitik. Secara keseluruhan, metode UV-Vis *microplate* yang dikembangkan menunjukkan kontribusi terhadap GAC melalui miniaturisasi, penghematan sampel dan reagen, pengurangan waktu analisis, serta minimisasi limbah. Keunggulan tersebut dicapai dengan tetap mempertahankan kinerja analitik yang baik, sebagaimana ditunjukkan oleh linearitas yang tinggi, presisi dengan %RSD < 2%, serta *agreement* sekitar 99%. Namun, evaluasi ini terutama menggambarkan efisiensi penggunaan sumber daya dan belum mencakup penilaian komprehensif terhadap toksisitas atau bahaya reagen, konsumsi energi, karakteristik limbah, jumlah tahapan analisis, total penggunaan pelarut, throughput aktual, maupun metrik greenness seperti AGREE, GAPI, atau Analytical Eco-Scale. Oleh karena itu, hasil evaluasi GAC dalam penelitian ini diinterpretasikan sebagai indikator efisiensi sumber daya dan miniaturisasi prosedur analitik, bukan sebagai penilaian greenness secara menyeluruh.

Simpulan

Metode spektrofotometri UV-Vis *microplate* berhasil dikembangkan untuk menentukan total fenolik (TPC) dan total flavonoid (TFC) pada ekstrak etanol daun *Centella asiatica*. Panjang gelombang maksimum diperoleh pada 746 nm untuk TPC dan 432 nm untuk TFC. Evaluasi kinerja analitik menunjukkan hubungan linier pada rentang konsentrasi 10–100 µg/mL, dengan nilai R^2 masing-masing sebesar 0,99744 untuk asam galat dan 0,99951 untuk quercetin. Repeatability menunjukkan nilai %RSD < 2% pada seluruh konsentrasi standar yang dievaluasi. Pengujian terhadap konsentrasi nominal standar juga menunjukkan kesesuaian yang tinggi, tetapi hasil tersebut tidak diinterpretasikan sebagai *matrix recovery* karena pengujian *spike-recovery* pada ekstrak *C. asiatica* belum dilakukan. Ekstrak etanol daun *C. asiatica* menunjukkan kandungan TPC sebesar 350,417 ± 1,67 mg GAE/g ekstrak dan TFC sebesar 78,246 ± 1,314 mg QE/g ekstrak. Kedua nilai tersebut merupakan parameter terpisah berdasarkan standar ekuivalen yang berbeda dan tidak digunakan untuk menentukan dominasi relatif fenolik terhadap flavonoid. Dari aspek Green Analytical Chemistry, pendekatan *microplate* memungkinkan miniaturisasi dengan penggunaan sampel sebesar 12 µL untuk TPC dan 100 µL untuk TFC serta volume reaksi masing-masing 200 dan 110 µL. Pendekatan ini menunjukkan efisiensi penggunaan sampel dan reagen serta berpotensi mengurangi volume limbah. Namun, evaluasi GAC dalam penelitian ini masih berfokus pada efisiensi sumber daya dan belum merupakan *greenness assessment* yang komprehensif.

Daftar Referensi

Aguiar, G. S. (2026). Avaliar é preciso: precisão, validade e julgamento nos resultados avaliativos. *Revista Meta: Avaliação*, *18*(58), 149.

Aslami, Z., Padovano, W., & Tuffaha, S. H. (2026). Correlation. In *Translational Plastic Surgery* (pp. 153–156). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91168-9.00010-7

Eff, A. R. Y., Eden, Y., Rahayu, S. T., & Radji, M. (2025). Renin inhibition activity, phenolic and flavonoid contents of Centella asiatica (L.) Urb. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, *13*(3), 672–681.

Ezenarro, J., Schorn-García, D., & Boqué, R. (2026). Validation of multivariate analytical methods. In *Problem-Oriented Analytical Chemistry Driven by Chemometrics* (pp. 219–238). Elsevier.

Hiranpradith, V., Therdthai, N., Soontrunnarudrungsri, A., & Rungsuriyawiboon, O. (2025). Optimisation of Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolics and Flavonoids Content from Centella asiatica. *Foods*, *14*(2), 291.

Hossain, M. A., Ahmad, N. U., Alam, M., Hossain, M. M., & Sarkar, A. (2024). Screening of different extraction methods for maximum production of total flavonoids, tannins, and antioxidants from Centella asiatica. *Food Research*, *8*(1), 44–51.

Jacksier, A. T., & Weterings, W. (2017, May 1). Gaseous Calibration Standards: Manufacturing, Stability, Traceability and Uncertainty. *Offshore Technology Conference*.

Jurado, J. M., Alcázar, A., Muñiz-Valencia, R., Ceballos-Magaña, S. G., & Raposo, F. (2017). Some practical considerations for linearity assessment of calibration curves as function of concentration levels according to the fitness-for-purpose approach. *Talanta*, *172*, 221–229.

Khursheed, T., Khalil, A. A., Akhtar, M. N., Khalid, A., Tariq, M. R., Alsulami, T., Mugabi, R., & Nayik, G. A. (2024). Ultrasound-assisted solvent extraction of phenolics, flavonoids, and major triterpenoids from Centella asiatica leaves: A comparative study. *Ultrasonics Sonochemistry*, *111*, 107091.

Lawag, I. L., Nolden, E. S., Schaper, A. A. M., Lim, L. Y., & Locher, C. (2023). A Modified Folin-Ciocalteu Assay for the Determination of Total Phenolics Content in Honey. *Applied Sciences*, *13*(4), 2135.

Li, L., Zhao, H., Ni, N., Wang, Y., Gao, J., Gao, Q., Zhang, Y., & Zhang, Y. (2022). Study on the origin of linear deviation with the Beer-Lambert law in absorption spectroscopy by measuring sulfur dioxide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *275*, 121192.

Liu, Y., Huang, Q., Zhang, Z., Yang, P., Huang, Y., Huang, J., Tan, J., Xie, G., Chen, J., Chen, Y., Xie, C., & Zheng, Y. (2026). A structured multi-day experimental framework integrating green chemistry for the extraction and characterization of Berberine hydrochloride in undergraduate education. *Scientific Reports*, *16*(1), 8092.

Martin Sulistyani, Mahatmanti, F. W., Huda, N., & Prasetyo, R. (2025). Optimization of the Performance of a Microplate Type UV-Vis Spectrophotometer as a Protein Content Testing Instrument Based on Green Analytical Chemistry (GAC). *Indonesian Journal of Chemical Science*, *14*(3), 114–123.

Ramos, RhayanneT. M., Bezerra, IsabelleC. F., Ferreira, MagdaR. A., & Soares, L. L. (2017). Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of Eugenia uniflora Linn. *Pharmacognosy Research*, *9*(3), 253.

Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *129*, 115913.

Sajid, M., & Płotka-Wasylka, J. (2025). Green analytical chemistry metrics. In *Green Analytical Methods and Miniaturized Sample Preparation techniques for Forensic Drug Analysis* (pp. 23–54). Elsevier.

Sari, K. R. P., Ikawati, Z., Danarti, R., & Hertiani, T. (2023). Micro-titer plate assay for measurement of total phenolic and total flavonoid contents in medicinal plant extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, *16*(9), 105003.

Sharma, K., Bhusal, M., Magar, A. B., Pathak, I., Shrestha, L. K., & Sharma, K. R. (2025). Phytochemical analysis and green synthesis of silver nanoparticles using Centella asiatica leaf and stem extracts: An investigation of antibacterial activity. *PLOS One*, *20*(9), e0321172.

Sosa-España, G., Rodríguez-Orozco, V., Valdez-Salas, B., Castillo-Saenz, J., Beltran-Partida, E., Salvador-Carlos, J., & Gamboa-Becerra, R. (2026). Analytical Validation of UV-Vis Methods for Total Flavonoids, Polyphenols Content, and Antioxidant Capacity in Aqueous Anemopsis californica Leaf Extracts. *Food Analytical Methods*, *19*(7), 197.

Worsfold, Paul. J., & Zagatto, Elias. A. G. (2017). Spectrophotometry: Overview ☆. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier.

Wu, D., & Zhang, K. X. (2014). The Linear Relationship between Concentrations and UV Absorbance of Nitrobenzene. *Advanced Materials Research*, *955–959*, 1376–1379.