

KUANTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID DENGAN LC-MS/MS SECARA SIMULTAN

Kaliawan dan Prayogo Danardono

Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang, Jl. Soekarno Hatta No. 9, Malang, Indonesia
kaliawan@polinema.ac.id

ABSTRAK

Pengujian senyawa flavonoid dengan metode kromatografi cair spektrometri massa (LC-MS/MS) dikembangkan dan digunakan untuk kuantifikasi secara simultan. Senyawa flavonoid yang menjadi target pengujian adalah senyawa quercetin, quercetin-3-O-glikosida, taxifolin dan rutin. LC-MS/MS menjadi teknik pengujian menggunakan teknik ionisasi *electrospray* (ESI) dengan pola ionisasi positif maupun negatif. SRM (*Selected Reaction Monitoring*) dipilih untuk penentuan secara spesifik senyawa target berdasarkan quasi ion molekuler prekursor dan transisinya. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui seberapa jauh nilai pengukuran pada LC-MS/MS terhadap linieritas, presisi, akurasi, batas terendah deteksi dan batas terendah kuantifikasi. Hasil penelitian menunjukkan nilai linieritas mendekati satu, presisi dan akurasi dapat diterima/valid. Nilai LoD senyawa quercetin 42.9 ppb, quercetin 3-O-Glikosida sebesar 33 ppb, taxifolin 23.1 ppb, dan rutin 52.8 ppb. Sedangkan nilai LoQ senyawa quercetin 129 ppb, quercetin 3-O-Glikosida sebesar 99 ppb, taxifolin 69 ppb, dan rutin 159 ppb.

Kata Kunci: Kromatografi cair, MS/MS, Flavonoid

ABSTRACT

The liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and used for simultaneous quantification. The flavonoid compounds that were the test targets were quercetin, quercetin-3-O-glycosides, taxifolin and rutin compounds. LC-MS/MS is a testing technique using the electrospray ionization technique (ESI) with positive and negative ionization patterns. SRM (*Selected Reaction Monitoring*) was selected for the specific determination of target compounds based on quasi molecular precursor ions and their transitions. The purpose of this study was to determine how far the measurement value on LC-MS/MS is related to linearity, the lowest limit of detection and the lowest limit of quantification. The results showed that the linearity value was close to unity, the LoD value of quercetin 42.9 ppb, quercetin 3-O-Glycoside was 33 ppb, taxifolin 23.1 ppb, and routine 52.8 ppb. Meanwhile, the LoQ value of quercetin was 129 ppb, quercetin 3-O-Glycoside was 99 ppb, taxifolin 69 ppb, and routine was 159 ppb.

Keywords: Liquid chromatography, MS/MS, Flavonoids

1. PENDAHULUAN

Laboratorium pendidikan adalah unit penunjang akademik pada lembaga pendidikan, berupa ruangan tertutup atau terbuka, bersifat permanen atau bergerak, dikelola secara sistematis untuk kegiatan pengujian, kalibrasi, dan/atau produksi dalam skala terbatas, dengan menggunakan peralatan dan bahan berdasarkan metode keilmuan tertentu, dalam rangka pelaksanaan pendidikan, penelitian, dan pengabdian kepada masyarakat [1]. Saat ini Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang mempunyai peralatan kromatografi cair tandem massa spektrofotometer (LC-MS/MS).

Peralatan LC-MS/MS telah terbukti menjadi teknik analitik pilihan untuk sebagian besar pengujian berbagai tahap penemuan obat baru [2]. Validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduksibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis.

Metode pengujian dengan LC-MS/MS senyawa flavonoid, sekarang ini dianggap sebagai komponen yang sangat diperlukan dalam berbagai aplikasi *nutraceutical*, farmasi, obat-obatan dan kosmetik. Ini disebabkan oleh sifat anti-oksidatif, anti-inflamasi, anti-mutagenik dan anti-karsinogenik ditambah dengan kapasitasnya untuk memodulasi fungsi enzim seluler [3]. Banyak flavonoid terbukti memiliki aktivitas antioksidan, kapasitas pembersihan radikal bebas, pencegahan penyakit jantung koroner, aktivitas hepatoprotektif, anti-inflamasi, dan antikanker, sementara beberapa flavonoid menunjukkan aktivitas antivirus potensial. Flavonoid membantu memerangi stres oksidatif dan bertindak sebagai pengatur pertumbuhan. Untuk keperluan farmasi, produksi massal yang efektif dari berbagai jenis flavonoid telah dimungkinkan dengan bantuan bioteknologi mikroba [4].

Pengujian dengan LC-MS/MS pada penelitian ini adalah kuantifikasi senyawa flavonoid seperti quercetin, rutin, taxifolin dan quercetin 3 glikosida. Kuantifikasi menggunakan metode perhitungan eksternal standar (ESTD). Tahapan pada penelitian ini meliputi pemilihan pelarut, baik untuk preparasi sampel maupun sebagai fase gerak pada LC dan pengaturan pada MS/MS. Kuantifikasi senyawa target dengan LC-MS/MS apakah bisa diterima/valid dengan analisis linieritas, presisi, akurasi, LoD dan LoQ.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Peralatan dan Bahan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisa Instrumental, Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang. Peralatan yang digunakan antara lain *Mass Spectrophotometer (TSQ Quantum Access Max)*, *LC (Accella 1250)* buatan Amerika Serikat, *ultrasonic cleaner*, mikropipet, neraca analitik, dan botol vial. Bahan standar yang digunakan pada penelitian ini meliputi quercetin 3-O glikosida, quercetin, taxifolin, rutin semua merupakan bahan standar yang diperoleh dari *Sigma Aldrich*. Bahan yang digunakan adalah acetonitrile dengan spesifikasi *gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv*, metanol, asam formiat (PA) diperoleh dari Merck KGa, Darmstadt Germany dan H₂O dari hasil pengolahan dengan peralatan *evaqua* di laboratorium kimia Analisa instrumental.

2.2. Persiapan Senyawa Uji

Bahan standar senyawa quercetin 3-O glikosida, quercetin, taxifolin, rutin dibuat dengan konsentrasi masing-masing 1000 µg/mL dengan pelarut metanol. Dibuat larutan standar deret dengan konsentrasi 0.06 µg/mL, 0.13 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2 µg/mL dan 4 µg/mL pada senyawa target. Fase gerak dibuat dengan kadar 0.1% asam formiat (A) dalam acetonitrile dan 0,1% asam formiat dalam H₂O (B).

2.3 Kondisi Operasi Peralatan

Kondisi operasi pada UPLC yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quaterner*, *autosampler* termostatik dikendalikan komputer melalui program *x-calibur 2.1*. Fase gerak dibuat terprogram dengan kecepatan 300 µL/menit dengan pengaturan komposisi, 0,0-1.0 menit 80% B, 1.0-2.0 menit 20% B, 2.0-3.0 menit 20% B, 3.0-3.5 menit 80% B. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *Hypersil Gold (50mm x 2.1mm x 1.9µm)*. Volume injeksi pada LC

adalah 1 μL . Kolom dikontrol pada suhu 30°C dan kompartemen *autosampler* diatur pada suhu 16°C. Kondisi operasi MS/MS *Triple Q* dengan sumber ionisasi *ESI (Electrospray Ionization)* dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dioperasikan dengan mode ionisasi negatif/positif. Pengaturan pada *spray voltage* pada 2,5 kV; Suhu penguapan 250 °C; Suhu kapiler 300 °C; nitrogen sebagai *sheath gas pressure* 40 psi, dan *Aux gas pressure* 10 psi dengan gas argon.

2.4. Linieritas

Melakukan pengujian secara langsung pada senyawa target terhadap respon detektor. Linearitas prosedur analitik merupakan kemampuannya (dalam kisaran tertentu) untuk mendapatkan hasil pengujian yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) analit dalam sampel [5].

2.5. Presisi

Pada penelitian ini dibuat 6 larutan dengan 3 kali pengulangan. Nilai presisi menunjukkan seberapa dekat suatu hasil pemeriksaan bila dilakukan berulang dengan sampel yang sama. Presisi atau *precision* adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel sampel yang diambil dari campuran yang homogen [6].

2.7. Akurasi

Sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa (*pure analite/standard*) ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. *Recovery* dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Perhitungan *recovery* dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut: [6]

$$\%Recovery = \frac{\text{hasil pemeriksaan (observasi)}}{\text{hasil perhitungan (diharapkan)}} \times 100 \quad (1)$$

2.8. LoD (DL) dan LoQ (QL)

Beberapa pendekatan untuk menentukan batas deteksi dimungkinkan, tergantung pada apakah prosedurnya non-instrumental atau instrumental. Pendekatan yang digunakan berdasarkan standar deviasi dari respon (σ) dan slope (S) [5].

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (2)$$

$$QL = \frac{10 \sigma}{S} \quad (3)$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi larutan standar dilakukan dengan *direct infusion* pada *Mass Spectrophotometer* dengan kecepatan 5 $\mu\text{L}/\text{menit}$. Pemindaian dilakukan dengan memasukkan kisaran nilai ion molekul bermuatan senyawa prekursor dan senyawa produk (transisi) pada masing-masing larutan standar. Pemindaian dilakukan menggunakan sumber *ESI (electrospray ionization)* dengan ionisasi positif dan negatif pada MS_1 (sebagai ion "*parent mass/prekursor*"), kemudian dilanjutkan dengan fragmentasi untuk mendapatkan ion transisi MS_2 (sebagai ion "*daughter mass/produk*"). Hal ini dilakukan sebagai dasar penentuan secara

kualitatif maupun kuantitatif pada senyawa target untuk memilih metode pengujian yang mempunyai nilai presisi dan akurasi yang tinggi

Tabel 1 menunjukkan bahwa berat molekul dan berat eksak terdapat perbedaan pada senyawa yang sama. Berat molekul merupakan berat relative yang diukur dalam satuan massa atom (u), sedangkan berat eksak dihitung berdasarkan rumus molekul menggunakan massa isotop spesifik. Pada massa spektrosopi dektesi berat molekul berdasarkan berat eksak tiap satuan muatan (m/z), sehingga suatu molekul menjadi bermuatan (ion molekuler) karena terjadinya ionisasi. Pola pembacaan pada LC-MS/MS menggunakan quasi ion molekuler sehingga dengan memperhatikan sumber ionisasi positif akan terbaca $[M+H]^+$, negatif $[M-H]^-$ dan bisa juga $[M+adduct]^+$.

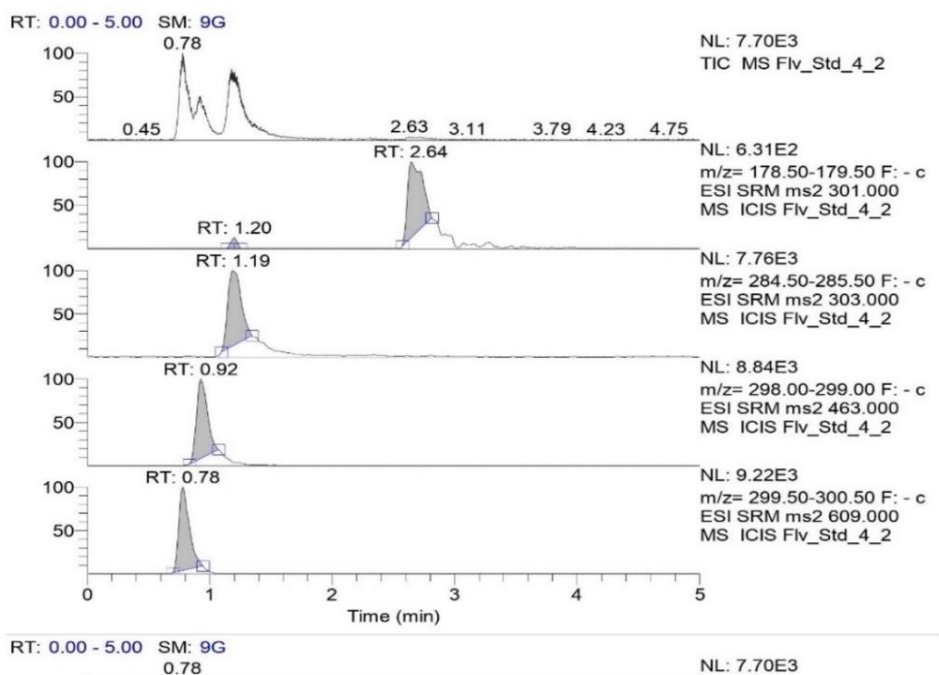
Tabel 1. Identifikasi ion prekursor dan transisi senyawa flavonoid

No	Nama Senyawa	Berat molekul (g/mol)	Berat eksak (g/mol)	Berat molekul Transisi m/z (energi)	Referensi Berat molekul (m/z) [7]
1	Quercetin	302.24	302.04	Neg. 179 (21) Pos. 153 (5), 137 (34)	Neg : 271.03, 179, 151 Pos : 229, 153
2	Quercetin 3-O-Glukosida	464.4	464.1	Neg. 300.5 (29), 298,5 (31) Pos. 303 (33),148.8 (52)	Neg : 300.03, 271.03 Pos : 303.05
3	Taxifolin	304.25	304.06	Neg. 285,29 (15), 284.25 (15) Pos. 286.47 (18), 272.79 (24)	Neg : 285.04, 151, 137.02 Pos : 287.06, 153.02, 139.04
4	Rutin	610.5	610.15	Neg. 301.08 (38), 299.43 (38)	Neg. 299.02, 300.03 Pos : 303.05, 304.05

Dari eksperimen yang telah dilakukan terdapat persamaan pada hasil pembacaan ion molekul prekursor (MS_1) dan transisi ion molekul produk (MS_2), dengan membandingkan *database spectral* massa dari Jepang. Hasil eksperimen muatan negatif mempunyai intensitas (kelimpahan) lebih tinggi dari pada positif, maka untuk analisis senyawa flavonoid digunakan muatan negatif.

3.1. Hasil Uji Kualitatif Senyawa Target

Hasil pengujian tersaji pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pemisahan antar senyawa flavonoid pada LC untuk quercetin pada 2.64 menit, taxifolin 1.19 menit, quercetin 3-O-glikosida 0.92 menit dan rutin 0.72 menit. Pemisahan pada MSMS diidentifikasi senyawa quercetin pada $301 m/z > 179 m/z$, taxifolin $303 m/z > 285 m/z$, quercetin-3-O-glikosida $463 m/z > 299 m/z$ dan rutin $609 m/z > 300 m/z$.



Gambar 1. Kromatogram senyawa flavonoid

Ada senyawa kimia mempunyai tingkat kelarutan, polaritas, struktur molekul, dan berat molekul hampir sama, maka dengan LC-MS/MS senyawa tersebut dapat dipisahkan menjadi senyawa target yang diinginkan. Hasil pemisahan relatif berdekatan terlihat pada senyawa rutin dan senyawa quercetin 3-O glikosida pada prinsip kromatografi (LC), selanjutnya dipisahkan oleh MS/MS, maka senyawa tersebut bisa terpisahkan dengan sempurna.

3.2. Hasil Uji Senyawa Target

Hasil pengukuran LC-MS/MS dengan metode SRM (selected reaction monitoring) seperti ditunjukkan pada Tabel 2. Senyawa quercetin mempunyai respon detector yang kecil dibandingkan dengan senyawa target lainnya. Pada konsentrasi 0.06 – 0.13 ppm respon detector yang dihasilkan sangat fluktuatif dan kecil, dan pada konsentrasi 0.25 ppm memberikan respon yang nilainya agak stabil. Data hasil pengujian dari pengulangan berbagai konsentrasi menunjukkan bahwa nilai RSD (%) bisa diterima/valid karena nilainya diantara rentang/kisaran. Nilai RSD (%) mengacu pada *Table A6. Predicted relative standard deviation of reproducibility (PRSDR) merujuk Table excerpted from Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data, HorRat for SLV.doc, 2004-01-18, AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA [8].*

Tabel 2. Pengukuran Senyawa Target dengan LC-MSMS

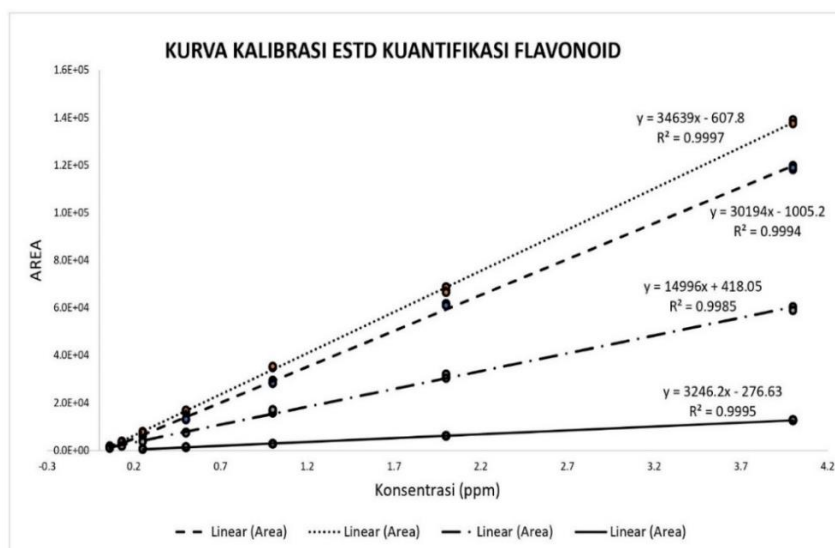
STD ppm	Q-3-OG			TAXIFOLIN			RUTIN			QUERCETIN			
	Area	TKR*	Acc**	Area	TKR	Acc	Area	TKR	Acc	Area	TKR	Acc	
0.06	1,190.25	0.07	78.81	1,882.85	0.07	80.16	1,211.15	0.05	111.90				
0.06	1,013.20	0.07	88.59	1,578.92	0.06	94.79	944.76	0.04	141.51				
0.06	1,267.70	0.08	74.54	1,795.34	0.07	84.37	990.76	0.04	136.40				
0.13	2,861.97	0.13	101.48	3,734.53	0.13	103.57	1,902.99	0.10	123.85				
0.13	3,000.68	0.13	97.95	3,938.36	0.13	99.04	1,850.49	0.10	126.55				
0.13	2,908.30	0.13	100.30	3,854.62	0.13	100.90	1,833.76	0.09	127.40				
0.25	6,649.95	0.25	98.59	7,987.09	0.25	100.75	3,816.07	0.23	109.37	610.07	0.27	90.74	
0.25	6,589.60	0.25	99.39	7,871.01	0.24	102.09	4,162.84	0.25	100.12	652.36	0.29	85.53	
0.25	6,014.77	0.23	107.00	7,782.38	0.24	103.11	3,733.16	0.22	111.59	590.82	0.27	93.11	
0.50	12,956.96	0.46	107.52	16,021.17	0.48	103.99	7,727.65	0.49	102.52	1,321.02	0.49	101.57	
0.50	13,185.07	0.47	106.01	15,975.76	0.48	104.25	7,643.16	0.48	103.65	1,403.39	0.52	96.49	
0.50	13,185.13	0.47	106.01	16,947.11	0.51	98.64	7,392.93	0.47	106.98	1,469.28	0.54	92.43	
1.00	28,225.43	0.97	103.19	35,088.50	1.03	96.95	15,812.68	1.03	97.34	2,862.49	0.97	103.30	
1.00	29,519.61	1.01	98.90	34,913.93	1.03	97.45	16,745.10	1.09	91.13	2,836.93	0.96	104.09	
1.00	28,348.37	0.97	102.78	35,394.65	1.04	96.06	17,160.92	1.12	88.35	2,827.04	0.96	104.39	
2.00	61,820.42	2.08	95.96	67,393.91	1.96	101.84	31,161.79	2.05	97.50	6,174.13	1.99	100.64	
2.00	61,316.42	2.06	96.80	68,842.26	2.00	99.75	32,131.21	2.11	94.26	6,093.31	1.96	101.89	
2.00	60,993.47	2.05	97.33	66,517.57	1.94	103.11	30,440.23	2.00	99.90	6,217.49	2.00	99.97	
4.00	119,879.59	4.00	99.91	138,237.42	4.01	99.79	59,944.14	3.97	100.76	12,797.41	4.03	99.31	
4.00	118,198.94	3.95	101.30	139,083.91	4.03	99.18	60,476.79	4.00	99.88	12,608.98	3.97	100.76	
4.00	118,990.24	3.97	100.65	137,506.49	3.99	100.32	58,892.24	3.90	102.52	12,860.22	4.05	98.83	
Rata-rata (%)			98.24				98.58				108.26	98.20	
SD			8.38				6.05				14.73	5.47	
RSD (%)			8.53				6.14				13.61	5.57	

* TKR = Terukur (respon detektor)

** Acc = Perbandingan nilai terukur dan standar

3.3. Hasil Uji Linieritas

Gambar 2. menunjukkan bahwa senyawa target nilai koefisien korelasi (R^2) mendekati satu. Hasil pengukuran pada linieritas menunjukkan nilai yang bisa diterima/valid karena nilai koefisien korelasi mendekati satu dan slope (kemiringan) menunjukkan respon yang proposional yang diberikan oleh respon deektor terhadap input dan output.



Gambar 2. Grafik kurva kalibrasi senyawa flavonoid

3.4. Hasil Uji Presisi dan Akurasi

Pengujian presisi senyawa target (Tabel 3) merupakan hasil rata-rata dari 3 kali pengulangan. Hasil pengujian menunjukkan bahwa terdapat kedekatan kesepakatan antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari beberapa pengambilan sampel dan dari sampel homogen yang sama. Presisi dinyatakan dalam ketidaktepatan dan dihitung sebagai deviasi standar relatif dari hasil tes. Standar deviasi relatif reproduktifitas dihitung dari *Horwitz* dan ketidaktepatan suatu metode meningkat seiring dengan penurunan konsentrasi analit. Nilai RSD(%) (Tabel 4) senyawa target lebih kecil dari *CV Horwitz* yang dinyatakan dalam metode reproduktibilitas. Merujuk Appendix F: *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* [8] pada Table A4, bahwa hasil uji senyawa target menunjukkan presisi bisa diterima/valid.

Tabel 3. Nilai presisi dan perolehan kembali (recovery)

Rata2 ulangan	Que-3-G		Taxifolin		Rutin		Quercetin	
	Presisi	%Rec	Presisi	%Rec	Presisi	%Rec	Presisi	%Rec
1	0,109	91,99	0,118	106,57	0,042	97,60	0,280	93,66
2	0,130	116,22	0,128	80,96	0,050	81,94	0,293	92,54
3	0,117	100,86	0,131	98,65	0,057	74,10	0,302	88,42
4	0,113	95,81	0,135	66,05	0,047	90,28	0,321	79,25
5	0,117	101,63	0,118	94,47	0,048	106,90	0,343	101,72
6	0,109	91,71	0,127	87,24	0,051	104,55	0,300	99,34

Keakuratan prosedur analitis mengungkapkan kedekatan kesepakatan antara nilai yang diterima, baik sebagai nilai sebenarnya yang konvensional atau nilai referensi (*certified reference materials*) yang diterima dan nilai yang ditemukan. Dalam penelitian ini tidak ada bahan CRM, maka dipakai perhitungan *recovery* (perolehan kembali). Evaluasi akurasi melalui uji perolehan kembali dengan menambahkan analit dari larutan standar (*spike*) hasil rata-rata 3 kali pengulangan (Tabel 3). Merujuk Appendix F: *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* [8] pada Table A5, hasil uji menunjukkan bahwa *recovery* dapat diterima/valid karena nilai toleransi pada kisaran 80-110% (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil uji presisi dan perolehan kembali (recovery)

Nama Senyawa	Jml X (ppm)	Average (c) ppm	SD (ppm)	RSD / CV (%)	CV Horwitz (%)	Average (Recovery) %	SD (Recovery) %	Mean Recovery %
Que-3-G	0,695	0,116	0,008	6,566	22,133	99,7	9,13	9.15
Taxifolin	0,756	0,126	0,007	5,33	21,85	88,99	14,32	16.10
Rutin	0,295	0,049	0,005	9,91	25,18	92,56	12,91	13.95
Quercetin	1,838	0,306	0,022	7,23	19,12	92,49	8,07	8.72

3.5. Uji LoD dan LoQ

Uji LoD dan LoQ dilakukan secara statistik melalui garis regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi dan uji regresi dari eksperimen yang telah dilakukan. Respon instrumen y secara linear berhubungan dengan konsentrasi x. Batas deteksi umumnya dinyatakan dalam $3,3\sigma/S$ untuk LoD dan $10\sigma/S$, di mana S adalah kemiringan dan σ adalah deviasi standar [5].

Hasil uji regresi menunjukkan sebaran rata-rata sampel terhadap rata-rata dari rata-rata keseluruhan sampel (rata-rata populasi/ σ) adalah Quercetin 3-O-Glikosida sebesar 299.395, taxifolin sebesar 237.621, rutin sebesar 258.925 dan quercetin sebesar 41.7 dan kemiringan (S) disajikan gambar 2. Uji nilai LoD senyawa target senyawa quercetin 42.9 ppb, quercetin 3-O-Glikosida sebesar 33 ppb, taxifolin 23.1 ppb, dan rutin 52.8 ppb. Sedangkan nilai LoQ senyawa quercetin 129 ppb, quercetin 3-O-Glikosida sebesar 99 ppb, taxifolin 69 ppb, dan rutin 159 ppb.

4. KESIMPULAN

Kuantifikasi senyawa flavonoids dengan LC-MS/MS secara simultan dapat disimpulkan: Hasil RSD% berada pada kisaran/rentang hasil pengukuran terhadap konsentrasi standar dan hasil linieritas, presisi, akurasi bisa diterima/valid. Uji nilai LoD senyawa target untuk senyawa quercetin 42.9 ppb, quercetin 3-O-Glikosida sebesar 33 ppb, taxifolin 23.1 ppb, dan rutin 52.8 ppb. Sedangkan nilai LoQ senyawa quercetin 129 ppb, quercetin 3-O-Glikosida sebesar 99 ppb, taxifolin 69 ppb, dan rutin 159 ppb. Hasil dari metode pengujian bisa diterapkan untuk pengujian sampel di bidang pendidikan, penelitian.

REFERENSI

- [1] PERMENPAN dan RB., 2019, *Peraturan Menteri Pendayagunaan Aparatur Negara dan Reformasi Birokrasi Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2019 Tentang Jabatan Fungsional Pranata Laboratorium Pendidikan*, Jakarta.
- [2] Korfmacher, W. A., 2005, *Foundation Review: Principles and Applications of LC-MS in New Drug Discovery*, Drug Discov. Today, 10(20), pp. 1357–1367.
- [3] Panche, A. N., Diwan, A. D., and Chandra, S. R., 2016, *Flavonoids: An Overview*, J. Nutr. Sci., 5.
- [4] Kumar, S., and Pandey, A. K., 2013, *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*, Sci. World J., 2013, pp. 1–16.
- [5] European Medicines Agency, 2006, *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 7 Westferry Circus Canary Wharf Lond. E14 4HB UK, p. 15.
- [6] Siregar, M. T., Wulan, W. S., Setiawan, D., and Nuryati, A., 2018, *Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medik (TLM) Kendali-Mutu*, Jakarta, Kementerian Kesehatan RI
- [7] Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M. Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, K., Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K., and Nishioka, T., 2010, *MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences*, J. Mass Spectrom., 45(7), pp. 703–714.
- [8] AOAC, 2016, *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, AOAC International.