

## TEKNIK VALIDASI METODE ANALISIS KANDUNGAN NITRIT DALAM AIR TAMBAK SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

*Sitti Rohani dan Sutrisyani*

*Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros*

### ABSTRAK

Validasi metode adalah suatu proses penetapan suatu syarat analitik, dan mengkonfirmasi bahwa suatu metode mempunyai kemampuan kinerja yang konsisten dengan apa yang menjadi keperluan aplikasi, atau untuk mengevaluasi kemampuan kinerja metode. Pengujian di laboratorium ini dilakukan untuk membuktikan bahwa metode analisis kandungan nitrit dalam air tambak secara spektrofotometrik memenuhi syarat untuk digunakan sehari-hari di laboratorium. Setiap metode yang akan digunakan sebaiknya divalidasi/verifikasi terlebih dahulu agar mampu dipercaya hasil yang dilaporkan oleh laboratorium. Hasil pengujian menunjukkan bahwa persamaan regresi linier yang diperoleh adalah  $Y = 2,9249x - 0,0006$  dengan koefisien korelasi = 0,9997, nilai perolehan kembali (% R) = 93,19% dan batas deteksi metode adalah 0,0008. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini dinyatakan valid karena memenuhi semua parameter atau karakteristik yaitu  $> 0,9950$  yang ditetapkan dengan persamaan regresi.

**KATA KUNCI:** validasi, nitrit, spektrofotometrik

### PENDAHULUAN

Metode analisis merupakan salah satu faktor penunjang dalam mendapatkan hasil yang akurat dan handal, metode ini juga dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa metode tersebut mempunyai unjuk kerja yang konsisten, sesuai dengan yang dikehendaki dalam penerapan metode (Perssulesy, 2005). Semua metode analisis sebaiknya divalidasi/verifikasi untuk membuktikan keandalannya, karena metode yang dinyatakan valid pada kondisi tertentu belum tentu valid pada kondisi lain karena peralatan dan pereaksi yang digunakan serta analisis yang mengerjakan sangat menentukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan validasi metode untuk menguji ketangguhan metode tersebut.

Dalam proses validasi metode, dibutuhkan peralatan spektrofotometer yang memenuhi spesifikasi, bekerja dengan baik dan terkalibrasi secara berkala. Begitu pula operator harus kompeten dan mempunyai pengetahuan yang cukup, sehingga mampu mengambil keputusan yang tepat selama proses berjalan (Tahid, 2009).

Dalam prosedur validasi terdapat beberapa parameter yang dievaluasi antara lain linieritas, presisi, akurasi, dan batas deteksi metode (MDL). Seluruh pengujian yang telah dilakukan dan memenuhi syarat tersebut adalah suatu pembuktian bahwa metode analisis di laboratorium dapat menunjukkan kehandalan penggunaannya. Data hasil analisis ini selanjutnya diolah untuk memperoleh nilai rata, linearitas, perolehan kembali, standar deviasi, dan batas deteksi metode. Kriteria penerimaan untuk korelasi adalah  $> 0,9950$ , *recovery*  $100 \pm 15\%$  (Anonim, 2007) dan standar deviasi relatif adalah  $< 2\%$ . Hasil validasi metode analisis dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan apakah metode tersebut dapat digunakan untuk pengujian di laboratorium.

Parameter nitrit merupakan parameter yang sering dipilih untuk melihat pencemaran lingkungan tambak. Metode ini menggunakan alat spektrofotometer dan dianalisis dengan cara mereaksikan nitrit dengan sulfanilamin yang dalam suasana asam yang akan membentuk senyawa kompleks berwarna merah,

warna yang terbentuk diukur serapannya pada panjang gelombang 520 nm.

Pengujian ini dilakukan untuk menguraikan tahapan teknik validasi metode analisis. Dalam hal ini akan diuraikan tentang teknik validasi pada analisis kandungan nitrit dalam air tambak secara spektrofotometri sehingga dapat digunakan untuk analisis rutin di laboratorium.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Kegiatan validasi metode analisis kandungan nitrit dalam air tambak ini dilaksanakan di Laboratorium Kualitas Air Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros, Sulawesi Selatan pada bulan Mei 2008. Bahan yang digunakan, sampel air tambak yang telah disaring dengan kertas saring Whatman No. 42, larutan standar nitrit (1 dan 5 mg/L), larutan Sulfanilamid, Natrium Etilen Diamin (NED), dan *deionizer*.

Peralatan yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-VIS, tabung kolorimeter volume 50 mL, rak tabung, labu ukur 25 mL, pipet volume 25 mL, dan pipet skala 1 dan 5 mL, labu semprot.

### Metode

Adapun teknik validasi metode ini, menurut Iyakyagaya (2009)

#### Penentuan Linearitas

- Dibuat larutan kurva standar nitrit: 0; 0,02; 0,04; 0,08; 0,12; 0,15; 0,18; 0,2 mg/L dengan memipet larutan standar nitrit 5 mg/L masing-masing 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,5; 1,8; dan 2 mL ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan *deionizer* sampai garis miniskus (tanda batas) kemudian dihomogenkan.
- Dipipet masing-masing larutan kurva standar sebanyak 25 mL ke dalam tabung kolorimeter. Ditambahkan masing-masing dengan larutan sulfanilamid 0,5 mL dan larutan NED 0,5 mL diencerkan dengan *deionizer* sampai tanda batas, dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit.
- Dibaca absorbannya pada panjang gelombang 520 nm dengan spektrofotometer UV-Vis
- Diukur linearitasnya.

#### Penentuan Akurasi (Ketepatan)

- Dibuat deret sampel air pada tabung kolorimeter sebanyak 10 buah yang masing-masing diisi 20 mL, dan ditambahkan *deionizer* sebanyak 5 mL.
- Pada 10 buah tabung kolorimeter yang lain masing-masing diisi 20 mL sampel air, dan ditambahkan larutan standar nitrit 1 mg/L (*spike*) sebanyak 5 mL.
- Ditambahkan masing-masing dengan larutan sulfanilamid 0,5 mL dan NED 0,5 mL lalu dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit.
- Dibaca absorbansi dan konsentrasi pada panjang gelombang 520 nm dengan spektrofotometer UV-Vis
- Dihitung : % *Recovery*

#### Penentuan Presisi (Ketelitian)

- Pada 10 buah deret tabung kolorimeter 50 mL diisi dengan larutan standar nitrit 0,01 mg/L sebanyak 25 mL.
- Ditambahkan masing-masing 0,5 mL larutan sulfanilamid dan 0,5 mL larutan NED dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit.
- Dibaca absorbansi dan konsentrasi pada panjang gelombang 520 nm dengan spektrofotometer
- Dihitung standar deviasi dan % RSD (koefisien korelasi)

#### Penentuan Batas Deteksi Metode (*Method Detection Limit = MDL*)

- Diisi 7 buah deret tabung kolorimeter dengan larutan standar 0,02 mg/L sebanyak 25 mL.
- Ditambahkan masing-masing 0,5 mL larutan sulfanilamid dan 0,5 mL larutan NED, dihomogenkan dan dibiarkan selama 15 menit.
- Dibaca absorbansi dan konsentrasi pada panjang gelombang 520 nm dengan spektrofotometer
- Dihitung standar deviasi dan % RSD (koefisien korelasi)

Perhitungan

$$X = \frac{\text{Konsentrasi standar} \times \text{volume spike}}{\text{Total volume}}$$

di mana:

X = Prediksi konsentrasi *spike*

Persentase perolehan kembali (% *recovery*):

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{(B - A)}{C} \times 100\%$$

di mana:

A = Konsentrasi rata-rata sampel + *deionizer*

B = Konsentrasi rata-rata sampel + *spike*

C = Prediksi *spike*

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{(C1 - C2)}{C3} \times 100\%$$

di mana:

C1 = Konsentrasi sampel + 5 mL *spike*

C2 = Konsentrasi sampel + *deionizer*

C3 = Total volume

$$\text{(\% RSD)} = \frac{\text{SD}}{\text{Rataan}} \times 100\%$$

di mana:

RSD = *Recovery standard deviation*

SD = Standar deviasi

## HASIL DAN BAHASAN

### Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode untuk mendapatkan hasil uji yang sebanding dengan konsentrasi analis. Syarat linearitas dapat ditentukan dari koefisien korelasi yang

mendekati =1 (Persulesy, 2005). Hasil analisis menunjukkan bahwa hubungan tersebut memenuhi persamaan linier  $Y = 2,9249x - 0,0006$  dengan koefisien korelasi 0,9997 (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa standar nitrit layak digunakan untuk analisis kandungan nitrit karena memenuhi kriteria keberterimaan yaitu  $> 0,9950$  (Oktavia, 2006).

### Akurasi

Akurasi menunjukkan kedekatan nilai hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya. Konsentrasi sampel yang ditambahkan *spike* (umpan) dapat diprediksi seperti yang diperlihatkan pada Tabel 1 sehingga diperoleh nilai yang mendekati nilai konsentrasi yang sebenarnya. Hasil nilai perolehan kembali adalah 93,04% sesuai kriteria keberterimaan  $100 \pm 15\%$  (Anonim, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis nitrit mampu dengan baik memperoleh kembali nilai konsentrasi nitrit pada air tambak dan memberikan hasil yang cukup baik.

### Prediksi *Spike*:

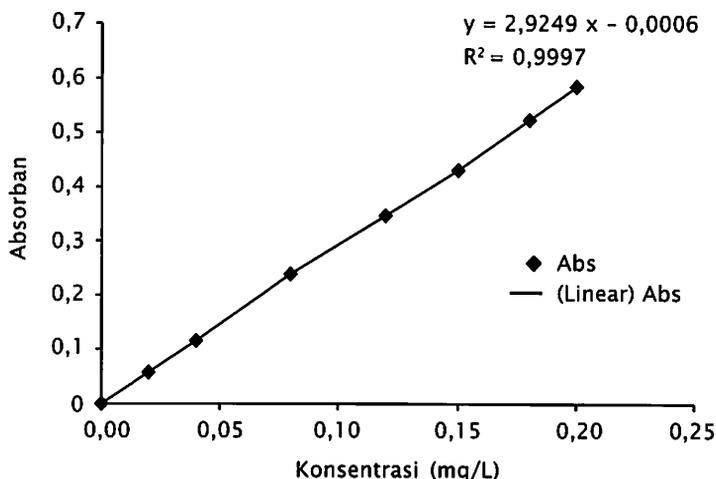
$$1 \text{ mg/L} = \frac{1 \text{ ug/mL} \times 5 \text{ mL (spike)}}{25 \text{ mL}}$$

$$= 0,2 \text{ ug/mL} = 0,2 \text{ mg/L}$$

$$X = \frac{(0,1870 - 0,00092)}{0,2} \times 100\% = 93,04\%$$

di mana:

X = % *Recovery*



Gambar 1. Grafik persamaan regresi linier larutan standar nitrit

Tabel 1. Hasil pengujian akurasi kandungan nitrit dalam sampel air tambak

Spl 20 mL + deionizer 5 mL		Spl 20 mL + spike 5 mL	
Absorban	Konsentrasi (mg/L)	Absorban	Konsentrasi (mg/L)
0,004	0,0011	0,538	0,1846
0,002	0,0005	0,531	0,1819
0,002	0,0006	0,556	0,1908
0,002	0,0005	0,546	0,1874
0,003	0,0007	0,569	0,1951
0,001	0,0003	0,539	0,1848
0,004	0,0012	0,549	0,1882
0,004	0,0010	0,545	0,1869
0,004	0,0011	0,539	0,1849
0,007	0,0022	0,541	0,1854
<b>Rataan</b>	<b>0,00092</b>		<b>0,1870</b>

**Presisi**

Presisi menunjukkan tingkat revitabilitas dari data yang diperoleh, ini dapat dilihat dari standar deviasi yang diperoleh dari pengukuran. Revitabilitas metode analisis dapat dilakukan terhadap larutan standar maupun larutan sampel untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Revitabilitas dikatakan baik bila nilai RSD (*Recovery Standard Deviation*) < 2%

(Riyadi, 2009) Hasil pengujian menunjukkan bahwa metode ini memiliki revitabilitas yang dapat diterima dengan nilai RSD pada larutan standar adalah 1,99% (Tabel 2).

**Batas Deteksi Metode**

Hasil uji batas deteksi metode analisis kandungan nitrit dapat dilihat pada Tabel 3, standar deviasi menunjukkan nilai 0,0003 dan

Tabel 2. Hasil pengujian presisi kandungan nitrit dalam sampel air tambak

Absorban	Konsentrasi (mg/L)
0,538	0,1846
0,531	0,1819
0,556	0,1908
0,546	0,1874
0,569	0,1951
0,539	0,1848
0,549	0,1882
0,545	0,1869
0,539	0,1849
0,541	0,1854
<b>Rataan</b>	<b>0,1870</b>
<b>Standar deviasi</b>	<b>0,0037</b>
<b>% Recovery standard deviation (CV)</b>	<b>1,9948</b>

Tabel 3. Hasil pengujian batas deteksi metode

Absorban	Konsentrasi (mg/L)
0,029	0,009748
0,032	0,009107
0,027	0,009360
0,027	0,009130
0,029	0,009821
0,028	0,009350
0,028	0,009465
<b>Rataan</b>	<b>0,0094</b>
<b>Standar deviasi</b>	<b>0,0003</b>
<b>Metode Detection Limit</b>	<b>0,0008</b>

koefisien variannya < 5%. Hasil yang diperoleh dengan mengalikan angka ketetapan 3,14 (APHA, 2005) maka menghasilkan nilai MDL 0,0008; berdasarkan hasil pengujian tersebut maka konsentrasi terkecil dari larutan standar yang masih bisa dideteksi oleh metode adalah 0,0008.

### KESIMPULAN

Validasi metode analisis kandungan nitrit dalam air tambak dengan menggunakan Spektrofotometer UV-VIS dinyatakan valid karena memenuhi semua parameter atau karakteristik yang ditetapkan yaitu: linearitas ( $R = 0,0097$ ); akurasi (*Recovery* = 94,04%); presisi ( $SD = 0,0037$ ); dan RSD (1,99%) dan batas deteksi metode (0,0008). Oleh karena itu, metode analisis ini dapat digunakan secara rutin di laboratorium.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Bapak Dr. Rachmansyah dan Dr. Brata Pantjara, M.S. yang telah memberikan masukan dan dukungan serta teman-teman teknisi di laboratorium air, yang telah membantu

pelaksanaan pengujian serta penulisan makalah ini.

### DAFTAR ACUAN

- Anonim. 2007. Pelatihan Personil Laboratorium ISO/IEC 17025 : 2005.
- APHA. 2005. Standard Method for Examination of Water and Wastewater 21<sup>th</sup> edition Instruction Manual, Shimadzu type UV-2401 PC Spektrofotometer UV-VIS.
- Oktavia, E. 2006. Buletin Teknik Pertanian II(1). Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.
- Persulesy, A.E. 2005. Tinjauan singkat cara memvalidasi Metode Pengukuran. *Warta Kimia Analitik*. Pusat Penelitian Kimia. LIPI.
- Riyadi, W. 2009. Validasi Metode Analisis.
- Tahid. 2009. Validasi Metode Spektroskopi. disampaikan pada kursus validasi/verifikasi metode pada analisis spektrofotometri UV/VIS di LIPI Bandung.
- Iyakuyagaya. 2009. Prosedur Validasi/Verifikasi Metode Pengujian.