

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR
KARAGENAN DALAM PRODUK NUTRIJELL
MENGUNAKAN PEWARNA *METHYLENE BLUE*
DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

**VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINING
CARRAGEENAN CONTENT IN NUTRIJELL
PRODUCTS USING METHYLENE BLUE DYE BY UV-
VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD**

**NURZAFIRA
N011201134**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR
KARAGENAN DALAM PRODUK NUTRIJELL
MENGUNAKAN PEWARNA *METHYLENE BLUE*
DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

**VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINING
CARRAGEENAN CONTENT IN NUTRIJELL
PRODUCTS USING METHYLENE BLUE DYE BY
UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD**

**NURZAFIRA
N011201134**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR KARAGENAN DALAM
PRODUK NUTRIJELL MENGGUNAKAN PEWARNA *METHYLENE
BLUE* DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

**VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINING CARRAGEENAN
CONTENT IN NUTRIJELL PRODUCTS USING METHYLENE BLUE DYE
BY UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

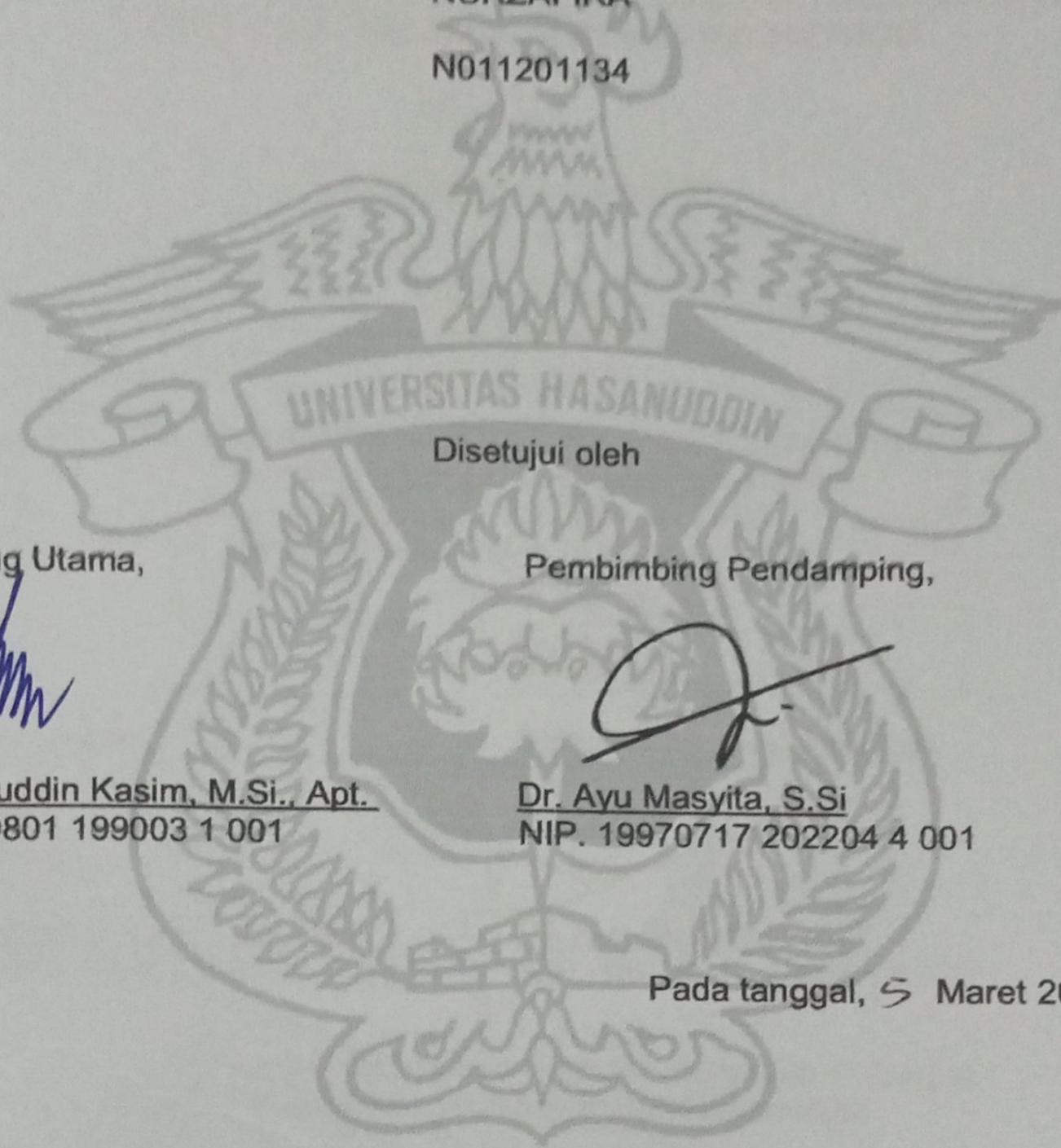
**NURZAFIRA
N011201134**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR KARAGENAN DALAM
PRODUK NUTRIJELL MENGGUNAKAN PEWARNA *METHYLENE BLUE*
DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

NURZAFIRA

N011201134



Disetujui oleh

Pembimbing Utama,

Dr. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt.
NIP. 19630801 199003 1 001

Pembimbing Pendamping,

Dr. Ayu Masyita, S.Si
NIP. 19970717 202204 4 001

Pada tanggal, 5 Maret 2024

SKRIPSI
VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR KARAGENAN DALAM
PRODUK NUTRIJELL MENGGUNAKAN PEWARNA METHYLENE
BLUE DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINING CARRAGEENAN
CONTENT IN NUTRIJELL PRODUCTS USING METHYLENE BLUE DYE
BY UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

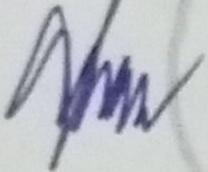
Disusun dan diajukan oleh :

NURZAFIRA
N011201134

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 29 Februari 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

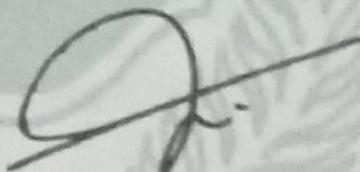
Menyetujui,

Pembimbing Utama,

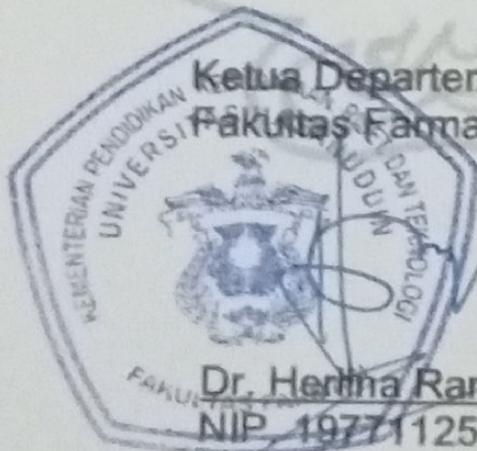


Dr. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt.
NIP. 19630801 199003 1 001

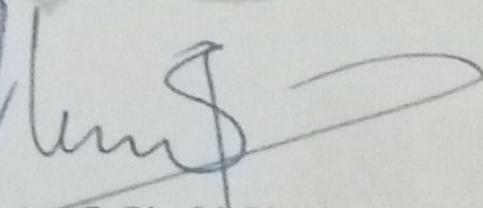
Pembimbing Pendamping,



Dr. Ayu Masyita, S.Si
NIP. 19970717 202204 4 001



Ketua Departemen Farmasi Sains dan Teknologi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin


Dr. Hertha Rante, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19771125 200212 2 003

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Nurzafira
Nim : N011201134
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul "Validasi Metode Penetapan Kadar Karagenan dalam Produk Nutrijell menggunakan Pewarna *Methylene Blue* dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS" benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 5 Maret 2024

Yang menyatakan


Nurzafira
N011 20 1134

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, tiada kata yang lebih patut diucapkan oleh seorang hamba yang beriman selain ucapan puji syukur ke hadirat Allah swt, Tuhan Yang Maha Mengetahui, pemilik segala ilmu, karena atas petunjuk-Nya maka skripsi ini dapat diselesaikan.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini, namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghanturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada

1. Para pembimbing bapak Dr. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt. dan ibu Dr. Ayu Masyita, S.Si yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing dan selalu mengarahkan penulis dalam proses penelitian dan penulisan karya ini.
2. Para penguji ibu Yuyu Mulsiani Evary, S.Si., M.Pharm.Sci., Apt. dan bapak Aminullah, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. yang telah memberikan penulis masukan-masukan yang sangat bermanfaat selama proses penelitian dan penulisan karya ini.
3. Institusi dekan dan wakil dekan farmasi Univeritas Hasanuddin yang selalu memberikan dukungan dan dorongan sehingga penulis dalam menyelesaikan karya ini.

4. Dosen pembimbing akademik bapak Rangga Meidianto Asri, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. yang selalu memberikan saran, dukungan dan dorongan kepada penulis hingga bisa sampai tahap ini.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada seluruh staf Fakultas Farmasi atas segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

Terkhusus lagi kepada teman-teman penulis Husnul Hatimah, Nurhaq Yuliarda, Vina Awalia Rustam, Tiara Minarfa S., Sherren Given Bevilia, Marwah Wirda Ningsih dan semua teman-teman HE20IN yang tidak bisa saya sebutkan namanya satu-satu atas dukungan dan semangat yang diberikan kepada penulis hingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan karya ini.

Akhirnya semua ini tiada artinya tanpa dukungan moril dari kedua orang tua tercinta Tisran dan Mulia dan saudara-saudara penulis Muhd. Zhulhilmi, Mumtaz Mursyidah, Fadhilah Nur Azizah dan Aiyaz Azka yang selalu memberikan doa yang tulus dan semangat kepada penulis hingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan karya ini.

Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, Maret 2024

Nurzafira

ABSTRAK

NURZAFIRA. *Validasi Metode Penetapan Kadar Karagenan Dalam Produk Nutrijell Menggunakan Pewarna Methylene Blue Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS* (dibimbing oleh Syaharuddin Kasim dan Ayu Masyita).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Bartlova *et al.*, 2021 analisis karagenan dapat dilakukan dengan *New Methylene Blue* (NMB) menggunakan spektrofotometri UV-VIS. Namun permasalahannya adalah pewarna NMB sulit diperoleh sehingga pada penelitian ini, penulis ingin mencoba menggunakan pewarna *methylene blue* yang lebih mudah diperoleh. Pewarna NMB memiliki struktur yang hampir sama dengan pewarna *Methylene Blue*, perbedaannya terletak pada posisi dan jumlah gugus metilnya. Pewarna NMB memiliki dua gugus metil yang melekat langsung pada struktur aromatik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui validitas metode spektrofotometri UV-VIS dengan pewarna *methylene blue* untuk penetapan kadar karagenan yang terdapat dalam sampel nutrijell. Validasi metode analisis dan penetapan kadar karagenan menggunakan spektrofotometri UV-VIS dengan pewarna *Methylene Blue* dianalisis pada panjang gelombang 556 nm dengan *operating time* 120-130 menit. Parameter validasi metode analisis yang dilakukan yaitu akurasi, presisi, linearitas, *Limit of Detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ) dan selektivitas. Sampel nutrijell yang digunakan diekstraksi menggunakan aquades dengan bantuan pemanasan pada suhu 70°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang digunakan telah memenuhi syarat parameter validasi metode analisis. Hasil uji *recovery* pada konsentrasi 10, 20 dan 30 ppm berturut-turut adalah 101%, 106% dan 101%. Hasil uji presisi pada konsentrasi 10, 20 dan 30 ppm berturut-turut adalah 1,40%, 0,85% dan 0,70%. Hasil uji linearitas didapatkan nilai koefisien korelasi 0,9992. Hasil uji LOD dan LOQ berturut-turut adalah 1,03 ppm dan 3,11 ppm. Pada uji selektivitas terdapat zat yang terdeteksi pada panjang gelombang sekitar 556 nm pada larutan baku dan larutan sampel. Rata-rata kadar karagenan yang terdapat dalam larutan stok nutrijell 1000 ppm adalah 2,286%.

Kata kunci : Karagenan, *methylene blue*, nutrijell, spektrofotometri UV-VIS, validasi metode analisis.

ABSTRACT

NURZAFIRA. Validation of Method for Determination of Carrageenan Content in Nutrijell Products Using Methylene Blue Dye by UV-VIS Spectrophotometric Method (supervised by Syaharuddin Kasim and Ayu Masyita).

Based on research conducted by Bartlova et al., 2021 carrageenan analysis can be done with New Methylene Blue (NMB) using UV-VIS spectrophotometry. However, the problem is that NMB dye is difficult to obtain so in this study, the authors want to try using methylene blue dye which is easier to obtain. NMB dye has a structure that is almost the same as Methylene Blue dye, the difference lies in the position and number of methyl groups. NMB dyes have two methyl groups attached directly to the aromatic structure. This study aims to determine the validity of the UV-VIS spectrophotometric method with methylene blue dye for the determination of carrageenan levels contained in nutrijell samples. Validation of analytical methods and determination of carrageenan levels using UV-VIS spectrophotometry with Methylene Blue dye was analyzed at a wavelength of 556 nm with an operating time of 120-130 minutes. The parameters of analytical method validation were accuracy, precision, linearity, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ) and selectivity. The nutrijell sample used was extracted using distilled water with the help of heating at 70°C. The results showed that the method used had met the requirements of the validation parameters of the analysis method. The recovery test results at concentrations of 10, 20 and 30 ppm were 101%, 106% and 101%, respectively. Precision test results at concentrations of 10, 20 and 30 ppm were 1.40%, 0.85% and 0.70%, respectively. The linearity test results obtained a correlation coefficient value of 0.9992. The LOD and LOQ test results were 1.03 ppm and 3.11 ppm, respectively. In the selectivity test, there were substances detected at a wavelength of about 556 nm in the standard solution and sample solution. The average carrageenan content contained in 1000 ppm nutrijell stock solution is 2.286%.

Keywords: Carrageenan, methylene blue, nutrijell, UV-VIS spectrophotometry, analytical method validation.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
I.1 Karagenan	4
I.1.1 Pengolahan Karagenan	7
I.1.2 Kegunaan Karagenan	8
I.1.3 Alga Penghasil Karagenan	9
I.2 Spektrofotometri UV-VIS	10
I.2.1 Penjabaran Hukum <i>Lambert Beer</i>	11
I.2.2 Keterbatasan Hukum <i>Lambert Beer</i>	13
I.2.3 Pemilihan Panjang Gelombang Maksimum	14

	halaman
I.2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Absorbansi	15
I.2.5 Membuat Kurva Kalibrasi	16
I.2.6 Instrumentasi Spektrofotometer UV-VIS	17
I.3 Perbedaan <i>New Methylene Blue</i> dan <i>Methylene Blue</i>	19
I.4 Validasi Metode Analisis	20
I.4.1 Parameter Validasi Metode Analisis	21
BAB III METODE PENELITIAN	31
III.1 Alat dan Bahan	31
III.2 Metode Kerja	31
III.2.1 Preparasi	31
III.2.2 Validasi Metode Analisis	33
III.2.3 Penetapan Kadar Karagenan dalam Produk Nutrijell	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	38
IV.1 Panjang Gelombang Maksimum	38
IV.2 Penetapan <i>Operating Time</i>	41
IV.3 Validasi Metode Analisis	43
IV.3.1 Akurasi	43
IV.3.2 Presisi	44
IV.3.3 Linearitas	45
IV.3.4 LOD dan LOQ	46
IV.3.5 Selektivitas	47
IV.4 Penetapan Kadar Karagenan dalam Produk Nutrijell	49

	halaman
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	51
V.1 Kesimpulan	51
V.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. <i>Operating time</i> karagenan	42
2. Hasil uji akurasi	44
3. Hasil uji presisi	45
4. Hasil uji linearitas	45
5. Hasil perhitungan LOD dan LOQ	47
6. Hasil pengukuran kadar karagenan dalam sampel nutrijell	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Konversi lambda karagenan menjadi theta karagenan	5
2. Konversi nu karagenan menjadi iota karagenan	5
3. Konversi mu karagenan menjadi kappa karagenan	6
4. Skema pengolahan karagenan	8
5. Spektrofotometer UV-VIS	10
6. Bagan kuvet	12
7. Struktur <i>methylene blue</i> dan <i>new methylene blue</i>	20
8. Spektrum panjang gelombang maksimum	39
9. Mekanisme reaksi <i>methylene blue</i> dan karagenan	40
10. Grafik <i>operating time</i>	42
11. Grafik linearitas	46
12. Spektrum baku karagenan dan sampel nutrijell	49
13. Penimbangan <i>methylene blue</i>	74
14. Pembuatan larutan baku	74
15. Uji akurasi & presisi	74
16. Penyiapan larutan sampel	74
17. Ekstraksi sampel	74
18. Penguapan pelarut	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja pembuatan larutan baku karagenan	57
2. Skema kerja penentuan panjang gelombang maksimum	58
3. Skema kerja penetapan <i>operating time</i>	59
4. Skema kerja pembuatan kurva baku, uji linearitas, LOD&LOQ	60
5. Skema kerja pembuatan larutan sampel	61
6. Skema kerja uji akurasi dan presisi	62
7. Skema kerja uji selektivitas	63
8. Skema kerja penetapan kadar karagenan dalam produk nutrijell	64
9. Hasil analisis spektrofotometri UV-VIS	65
10. Perhitungan	71
11. Dokumentasi	74

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Nutrijell merupakan serbuk jeli instan, yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat di Indonesia. Secara umum, Nutrijell terdiri dari bahan pembentuk gel (seperti karagenan dan agar), gum, garam dan bahan pengisi. Nutrijell digunakan sebagai makanan penutup, memiliki kadar serat tinggi, dan kadar kalori rendah sehingga disukai oleh masyarakat di Indonesia (Sinurat *et al.*, 2010).

Karagenan merupakan bahan yang biasanya digunakan sebagai bahan tambahan dalam makanan, yaitu sebagai pembentuk gel dan pengental yang digunakan dalam keju, puding, makanan penutup dan daging yang telah diolah (Bartlová *et al.*, 2021). Menurut Isrul *et al.*, 2020 karagenan bisa menyebabkan terjadinya inflamasi. Hasil percobaan pada tikus yang diinduksi karagenan akan meningkatkan kadar COX-2 sehingga akan menyebabkan pembentukan edema. Karagenan dapat terdegradasi menjadi poligenan pada pH asam (0,9-1,3) dan suhu tinggi (85-95°C) untuk waktu yang lama (hingga 6 jam) (Blakemore *et al.*, 2014). Hidrolisis asam (pencernaan) menimbulkan pemutusan polimer karagenan menjadi bentuk terdegradasi, yaitu poligenan. Asam lambung normal dapat bekerja pada karagenan yang dikonsumsi dan mengubah menjadi poligenan dengan berat molekul lebih rendah selama proses pencernaan. Di samping itu, beberapa bakteri usus memiliki enzim karagenase yang dapat

mendegradasi karagenan (Wikanta'r & Kurniawan, 2005). Menurut referensi dan hasil percobaan pada hewan, asupan karagenan yang terdegradasi secara berlebihan dapat merusak saluran pencernaan, menginduksi peradangan, dan menyebabkan perkembangan tumor dan penyakit lainnya (Sun *et al.*, 2021).

Sun *et al.*, 2021 telah melakukan analisis karagenan yang terdapat pada daging ternak dan unggas dengan menggunakan UHPLC-MS/MS. Metode tersebut telah menjadi metode utama untuk deteksi dan analisis bahan tambahan makanan karena pemisahannya yang baik, selektivitas tinggi dan sensitivitas tinggi. Pada penelitian tersebut digunakan kolom *Acquity UPLC BEH HILIC C18* (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm) menggunakan elusi gradien dengan metanol dan asam format 0,1% (v/v) dalam air sebagai fase gerak. Waktu retensi karagenan sekitar 1,3 menit dan hasil validasi yang diperoleh semuanya memenuhi syarat. Menurut (Jia & Bartlett, 2020) analisis menggunakan UHPLC-MS/MS relatif lebih mahal. Untuk itu perlu mencari metode alternatif yang lebih sederhana dan murah, salah satunya dengan metode spektrofotometri UV-VIS.

Penelitian yang dilakukan oleh Bartlova *et al.*, 2021 menunjukkan bahwa analisis karagenan dapat dilakukan dengan *New Methylene blue* (NMB) menggunakan spektrofotometri UV-VIS. Namun permasalahannya adalah pewarna NMB sulit diperoleh sehingga pada penelitian ini, penulis ingin mencoba menggunakan pewarna *methylene blue* yang lebih mudah diperoleh. Pewarna NMB memiliki struktur yang hampir sama dengan

pewarna *methylene blue*, perbedaannya terletak pada posisi dan jumlah gugus metilnya. Pewarna NMB memiliki dua gugus metil yang melekat langsung pada struktur aromatik (Bartlová *et al.*, 2021).

Adanya modifikasi prosedur analisis tersebut di atas memerlukan validasi sebelum digunakan untuk penetapan kadar karagenan. Adapun parameter validasi yang akan ditentukan adalah akurasi, presisi, linearitas, LOD & LOQ dan selektivitas.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka masalah-masalah yang dapat dirumuskan yaitu :

1. Apakah prosedur analisis menggunakan metode spektrofotometri UV-VIS dengan pewarna *methylene blue* valid untuk digunakan dalam analisis karagenan?
2. Berapa konsentrasi karagenan yang terdapat dalam sampel nutrijell?

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan :

1. Validitas metode spektrofotometri UV-VIS dengan pewarna *methylene blue* untuk penetapan kadar karagenan.
2. Konsentrasi karagenan yang terdapat dalam sampel nutrijell.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

I.1 Karagenan

Karagenan merupakan senyawa hidrokoloid yang dihasilkan oleh alga yang termasuk dalam kelompok *rhodophyta* (alga merah) dan *phaeophyta* (alga coklat) (Moelyono, 2016). Senyawa itulah yang membuat alga bersifat fleksibel dan kuat. Sifat *gelling* karagenan terjadi karena karbohidrat dan ion kalsium yang dimilikinya. Karagenan memiliki tekstur gel yang sangat bervariasi, dimulai dari pengental yang sederhana sampai yang kuat (Winarno & Winarno, 2017).

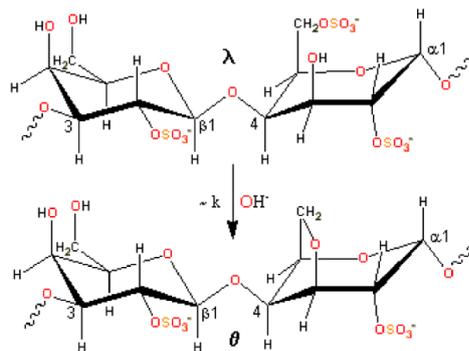
Awal penggunaan karagenan adalah di Irlandia sejak 1810, saat itu alga diresepkan agar dididihkan dalam susu untuk menyembuhkan masalah pernapasan. Nama karagenan berasal dari "*carraigin*" yang berarti "lumut" yang mengacu pada alga. Dari Irlandia, penggunaan karagenan mencapai New England bersama dengan imigrasi pada abad ke-18 dan ke-19. Karagenan selanjutnya berkembang pesat selama masa Perang Dunia II (Winarno & Winarno, 2017).

Karagenan merupakan senyawa hidrokoloid yang larut dalam air, secara kimia tersusun dari ester kalium, natrium, magnesium dan kalsium sulfat dengan galaktosa dan kopolimer 3,6 anhidrogen galaktosa. Karagenan merupakan polisakarida linier, yaitu suatu molekul galaktan yang unit utamanya adalah galaktosa (Moelyono, 2016).

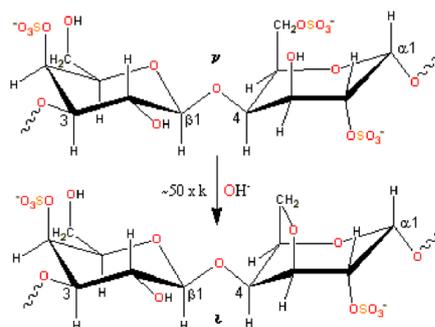
Beberapa jenis karagenan yang dikenal yaitu karagenan kappa, karagenan iota, karagenan lambda, karagenan mu, karagenan nu dan karagenan theta (Moelyono, 2016).

Mu karagenan dan nu karagenan merupakan prekursor biologis kappa karagenan dan iota karagenan. Kappa karagenan dan iota karagenan merupakan hibrida, sehingga bagian kappa karagenan selalu terdapat pada iota karagenan dan sebaliknya. Mu karagenan dan nu karagenan juga selalu hadir dalam fraksi kecil pada keduanya (Moelyono, 2016).

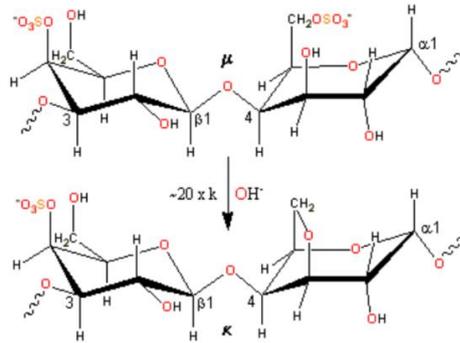
Karagenan lambda dapat dikonversi menjadi karagenan theta, karagenan nu dapat dikonversi menjadi karagenan iota, dan karagenan mu dapat dikonversi menjadi karagenan kappa (Moelyono, 2016).



Gambar 1. Konversi lambda karagenan menjadi theta karagenan (Moelyono, 2016)



Gambar 2. Konversi nu karagenan menjadi iota karagenan (Moelyono, 2016)



Gambar 3. Konversi mu karagenan menjadi kappa karagenan (Moelyono, 2016)

Karagenan merupakan serbuk berwarna kuning-putih dengan sifat kelarutan yang berbeda pada pelarut yang berbeda. Kappa karagenan larut dalam air panas bersuhu di atas 60°C dan dalam susu panas. Garam natrium larut dalam air dingin, sedangkan garam kalsium dan kalium tidak larut. Pada susu dingin, karagenan akan mengembang. Dalam larutan gula pekat yang panas ia akan larut, tetapi tidak dalam larutan garam pekat. Lambda karagenan larut dalam air panas atau dingin, larut dalam susu panas atau dingin, larut dalam larutan gula atau larutan garam pekat. Iota karagenan larut dalam air panas di atas 60°C , garam natrium larut dalam air dingin, dan garam kalsium memberikan kemampuan disperse tiksotropik, larut dalam susu panas, tidak larut dalam susu dingin, tidak larut dalam larutan gula pekat dan mudah larut dalam larutan garam pekat panas (Moelyono, 2016).

Kappa, iota dan lambda karagenan memiliki stabilitas yang berbeda pada lingkungan dengan pH berbeda. Pada pH netral dan basa, kappa karagenan, lambda karagenan dan iota karagenan sangat stabil, tetapi ketiga jenis karagenan ini mudah terhidrolisis dalam kondisi panas. Kappa

dan iota karagenan membentuk gel yang stabil, sedangkan lambda karagenan tidak membentuk gel (Moelyono, 2016).

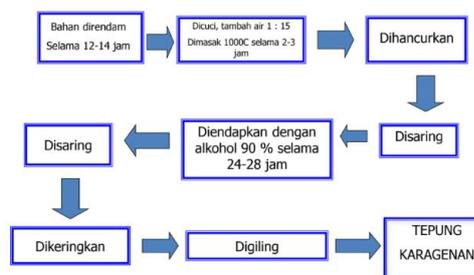
I.1.1 Pengolahan karagenan

Pengolahan karagenan ada dua jenis, yaitu pengolahan skala industri rumahan atau pengolahan industri skala besar. Pada dasarnya kedua proses pengolahan tersebut bisa dibilang sama, yaitu beberapa tahapan pengolahan antara lain pencucian, perendaman, pemasakan, penggilingan, penyaringan, pengendapan, pengeringan, dan penggilingan menjadi bubuk karagenan. Perbedaannya hanya terletak pada teknik pengerjannya, terkait dengan peralatan yang digunakan (Moelyono, 2016).

Pada pengolahan karagenan skala industri rumahan, rumput laut direndam dalam air tawar selama 12 hingga 24 jam lalu dicuci. Rumput laut yang sudah bersih dicampur dengan air dengan perbandingan kurang lebih 1 : 15 – 1 : 20. Campuran tersebut direbus selama 2-3 jam sambil diaduk rata hingga bahan larut. Setelah dingin saring dengan kain, lalu tambahkan alkohol 90% ke dalam filtratnya, diamkan selama 24-28 jam hingga terbentuk endapan. Saring endapannya, keringkan selama 3-4 hari, lalu giling hingga diperoleh bubuk karagenan (Moelyono, 2016).

Dalam pengolahan skala industri, rumput laut dicuci dengan air tawar, lalu dikeringkan hingga kadar air dalam bahan mencapai 15-25%. Bahan kemudian dibasakan dengan air kapur dan dicampur dengan air panas. Campuran dipanaskan pada suhu 90-95°C selama 24 jam. Campuran disaring melalui saringan dan pengepresan. Ke dalam filtrate ditambahkan

isopropyl alkohol hingga terjadi penggumpalan. Gumpalan disaring dan dicuci dengan alkohol segar, lalu dikeringkan hingga diperoleh bahan kering. Bahan kering digiling hingga diperoleh tepung karagenan (Moelyono, 2016).



Gambar 4. Skema pengolaha karagenan (Moelyono, 2016)

I.1.2 Kegunaan karagenan

Saat ini, karagenan telah menyebar luas di industri pangan dan menempati tempat pertama sebagai aditif yang diekstrak dari alga (Winarno & Winarno, 2017). Secara umum karagenan digunakan untuk meningkatkan sifat sediaan farmasi dalam bentuk suspence atau emulsi, antara lain (Moelyono, 2016) :

- a) sebagai stabilisator sediaan es krim, yaitu pada kadar 0,01-0,05%
- b) kadar 0,02-0,03% digunakan sebagai stabilisator susu coklat
- c) sebagai pengental pada industri roti
- d) sebagai pembentuk gel
- e) kadar 0,8-1,2% pada pasta gigi akan memperhalus tekstur karena sifatnya sebagai pengemulsi

I.1.3 Alga penghasil karagenan

Ada beberapa jenis alga penghasil karagenan, yang terdiri atas beberapa jenis yaitu *Chondrus*, *Euchema*, *Gigartina*, dan *Hypnea*. Beberapa diantaranya adalah (Moelyono, 2016) :

- a) *Chondrus crispus* merupakan rumput laut penghasil kappa, iota, dan lambda karagenan
- b) *Euchema cotonii* merupakan rumput laut penghasil kappa dan lambda karagenan
- c) *Euchema spinosum* merupakan rumput laut penghasil iota karagenan
- d) *Fulcellaria fastigiata* merupakan rumput laut penghasil kappa karagenan
- e) *Gigartina stellate* merupakan rumput laut penghasil kappa, iota dan lambda karagenan
- f) *Gigartina accicularis* merupakan rumput laut penghasil lambda dan kappa karagenan
- g) *Gigartina pistillata* merupakan rumput laut penghasil lambda dan kappa karagenan
- h) *Hypnea muciformis* merupakan rumput laut penghasil kappa karagenan
- i) *Hypnea nidifica* merupakan rumput laut penghasil kappa karagenan
- j) *Hypnea setosa* merupakan rumput laut penghasil kappa karagenan

I.2 Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri UV-Vis merupakan gabungan antara spektrofotometri UV dan Visibel, menggunakan dua cahaya lampu berbeda yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya visibel (Nazar, 2018).



Gambar 5. Spektrofotometer UV-VIS (Nazar, 2018)

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang paling banyak tersedia dan populer digunakan. Hal tersebut disebabkan karena metode ini dapat digunakan untuk sampel yang berwarna dan yang tidak berwarna. Penyerapan dalam rentang visibel secara langsung mempengaruhi warna bahan kimia yang terlibat (Nazar, 2018).

Spektrofotometri visibel merupakan spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia dengan panjang gelombang antara 380-750 nm. Sumber sinar yang umumnya digunakan pada spektrofotometri visibel adalah lampu Tungsten. Tungsten atau Wolfram merupakan unsur kimia dengan simbol W dengan $Z = 74$ dan memiliki titik didih yang tertinggi dibanding logam lainnya, yaitu 3422°C . Berdasarkan sifat tersebut, maka tungsten digunakan sebagai sumber lampu (Nazar, 2018).

Sampel yang dapat dianalisis dengan spektrofotometri visibel hanya sampel yang memiliki warna. Oleh karena itu, untuk sampel yang tidak memiliki warna, harus dibuat kompleks terlebih dahulu dengan reaksi spesifik sehingga akan menghasilkan senyawa berwarna yang stabil dan dapat memancarkan gelombang antara 450-750 nm (Nazar, 2018).

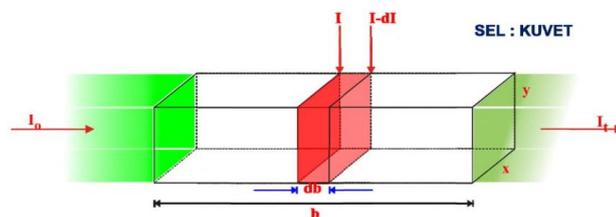
Spektrofotometri UV didasari pada interaksi sampel dengan sinar UV yang memiliki panjang gelombang 190-380 nm. Sumber sinar UV diperoleh dari lampu deuterium. Deuterium merupakan isotop hidrogen yang stabil, bisa ditemukan secara berlimpah di laut dan daratan. Inti atom deuterium mempunyai satu proton dan satu neutron, sementara hidrogen hanya memiliki satu proton dan tidak memiliki neutron. Sinar UV tidak dapat dilihat oleh mata manusia. Berdasarkan hal tersebut, senyawa yang dapat menyerap sinar ini biasanya senyawa yang tidak memiliki warna (Nazar, 2018).

I.2.1 Penjabaran hukum *Lambert Beer*

Dalam analisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis, sampel akan dikenakan berkas radiasi atau cahaya kemudian diukur intensitas radiasi yang di transmisikan. Sampel ditempatkan dalam sel atau kuvet yang dibuat dari gelas khusus. Radiasi yang diserap oleh sampel ditentukan dengan membandingkan intensitas dari berkas radiasi yang ditransmisikan oleh larutan blanko dengan intensitas yang ditransmisikan oleh sampel. Kekuatan radiasi atau intensitas radiasi/sinar sebanding dengan jumlah foton per detik yang melalui satu satuan luas penampang

kuvet. Kekuatan radiasi akan mengalami penurunan apabila terjadi penghamburan dan pantulan. Namun peluang kejadian dua hal tersebut sangat kecil bila dibandingkan dengan serapan (Sastrohamidjojo, 2013).

Gambar 5 menggambarkan radiasi atau sinar monokromatik yang melalui kuvet yang berisi sampel yang akan dianalisis. Kuvet memiliki dimensi panjang b cm, lebar X cm dan tinggi Y cm. Intensitas sinar awalnya I_0 dan setelah melewati kuvet sepanjang b cm intensitas sinar berubah menjadi I_t (Sastrohamidjojo, 2013).



Gambar 6. Bagan kuvet (Sastrohamidjojo, 2013)

Untuk mengetahui berapa pengurangan intensitas cahaya setelah melewati kuvet sepanjang b , dapat kita gunakan logika matematik, yaitu kita asumsikan kuvet dibagi menjadi bagian-bagian yang kecil-kecil atau menjadi segmen-segmen yang jumlahnya tak terhingga (*infinite*). Perhatikan potongan kecil kuvet yaitu bagian db . Pada awalnya sinar akan mengenai bagian depan db , sinar memiliki intensitas sebesar I , dengan menggunakan notasi deferensial kalkulus, dI , menyatakan hubungan penurunan intensitas cahaya setelah melewati segmen setebal db , sehingga intensitas sinar akan menjadi $(I - dI)$. Serapan sinar merupakan interaksi fisika antara foton dengan molekul-molekul sampel. Serapan juga dapat diartikan sebagai tumbukan. Tumbukan sebanding dengan jumlah

sampel dan jumlah foton. Jika jumlah sampel dilipatkan, maka jumlah tumbukan juga akan berlipat, berkurangnya tenaga cahaya, dl , berbanding langsung dengan N (jumlah sampel) dan I (jumlah foton per luas penampang per detik) (Sastrohamidjojo, 2013).

Berdasarkan hal tersebut, persamaan hukum *Lambert Beer* adalah sebagai berikut :

$$-\log T = A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (1)$$

$-\log T$ didefinisikan sebagai absorbansi (simbol A) atau kerapatan optik. Nilai ϵ merupakan karakteristik untuk molekul atau ion penyerap dalam pelarut tertentu dan pada panjang gelombang tertentu. Nilai ϵ tidak bergantung pada konsentrasi dan panjang lintasan radiasi. Nilai b merupakan panjang kuvet dan nilai C merupakan konsentrasi sampel yang akan dianalisis (Sastrohamidjojo, 2013).

I.2.2 Keterbatasan hukum *Lambert Beer*

Berdasarkan hukum *Lambert-Beer* kurva kalibrasi antara absorbansi (A) terhadap variasi konsentrasi (C) akan menghasilkan grafik yang lurus dan melalui (0,0) atau intersep = 0 dan *slope* = ab atau ϵb . Tetapi pada prakteknya sering kita temui adanya grafik yang non linear atau tidak melalui titik (0,0). Untuk menghindari hal-hal tersebut, maka ada beberapa syarat yang harus dipenuhi dengan baik (Khaldun, 2018):

- 1) Konsentrasi analit yang digunakan harus memiliki konsentrasi yang encer. Jika larutan yang digunakan pekat, maka akan terjadi interaksi antara molekul dan juga menyebabkan peningkatan

indeks refraksi sehingga akan mempengaruhi absorptivitas (a atau ϵ). Nilai A yang baik berkisar antara 0,2-0,8.

- 2) Tidak boleh terjadi reaksi kimia di dalam larutan selama proses pengukuran analit, misalnya reaksi pominerisasi, hidrolisis, asosiasi ataupun disosiasi. Adanya reaksi tersebut bisa menyebabkan terjadinya hukum *Lambert-Beer*.
- 3) Larutan yang digunakan harus bersifat jernih. Larutan yang bersifat memancarkan *pendar-fluor*, suspense atau koloid tidak selalu mengikuti hukum *Lambert-Beer*.
- 4) Cahaya yang digunakan harus bersifat monokromatis atau hanya satu panjang gelombang. Apabila yang digunakan cahaya polikromatis bisa menyebabkan terjadinya deviasi negatif. Selain itu, perlu dihindari adanya sesatan sinar "*stray light*" dari luar yang dapat menyebabkan terjadinya kesalahan besar.

I.2.3 Pemilihan panjang gelombang maksimum (λ_{maks})

Sebelum dilakukan analisis, sangat penting dilakukan pemilihan panjang gelombang maksimum, karena pada panjang gelombang ini akan terjadi absorpsi cahaya yang optimum. Apabila pengukuran dilakukan pada panjang gelombang maksimum, maka akan diperoleh konsentrasi yang sebenarnya dan mengikuti kurva garis lurus. Apabila pengukuran yang dilakukan tidak tepat pada panjang gelombang maksimum maka akan menyebabkan terjadinya deviasi negatif (Khaldun, 2018).

I.2.4 Faktor-Faktor yang mempengaruhi absorbansi

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi absorbansi, yaitu jenis pelarut, pH larutan, suhu, konsentrasi elektrolit yang tinggi dan adanya ion asing atau zat pengganggu (Khaldun, 2018).

a) Pemilihan pelarut

Analisis dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis apabila sampel yang akan dianalisis berupa larutan, gas atau uap. Apabila sampel yang dianalisis berupa larutan, ada beberapa hal yang harus diperhatikan, antara lain (Khaldun, 2018):

- 1) Pelarut yang digunakan tidak mengandung sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada strukturnya dan tidak berwarna
- 2) Tidak terjadi interaksi antara molekul dengan senyawa yang dianalisis
- 3) Pelarut yang digunakan harus memiliki kemurniaan yang tinggi

b) Penentuan pH optimum

pH larutan sangat mempengaruhi kestabilan kompleks ligan-logam. Larutan penyangga dapat digunakan untuk mempertahankan kestabilan pH larutan. pH optimum ditentukan dengan melakukan serangkaian percobaan dimana konsentrasi analit tetap dan pH larutan divariasikan, kemudian semua larutan diukur pada λ_{maks} (Khaldun, 2018).

c) Pengaruh suhu

Suhu dapat mempengaruhi absorptivitas molar (ϵ) (Khaldun, 2018).

d) Perekasi warna

Perekasi warna adalah suatu senyawa kimia yang mampu memberikan atau membangkitkan warna dengan intensitas tinggi apabila bereaksi dengan ion-ion logam dan akan membentuk senyawa kompleks. Perekasi warna dibutuhkan untuk analisis dengan spektrofotometri UV-Vis di daerah sinar tampak (Khaldun, 2018).

e) Pengaruh ion pengganggu

Pengaruh ion pengganggu yang dapat ditoleransi jika kesalahan pembacaan absorbansi kurang dari 5% atau terjadi kesalahan konsentrasi kecil dari 3% (Khaldun, 2018).

I.2.5 Membuat kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan suatu garis yang diperoleh dari titik-titik yang menyatakan suatu konsentrasi terhadap absorbansi yang diserap setelah dilakukan analisis regresi linier. Kurva kalibrasi dapat digunakan apabila kita meyakini bahwa komposisi larutan sampel sama dengan larutan standar. Sebaiknya konsentrasi sampel berada antara konsentrasi-konsentrasi larutan standar (Khaldun, 2018).

Absorbansi larutan standar sebaiknya dibuat antara (0,20 – 0,80) untuk menghindari adanya penyimpangan hukum *Lambert-Beer*. Apabila absorbansi sampel yang digunakan berada di luar batas absorbansi larutan standar, maka dilakukan pengenceran atau pemekatan. Apabila tidak memungkinkan dilakukan pengenceran atau pemekatan, maka dilakukan

secara *spektrofotometri diferensial* yaitu dengan “metode absorbansi tinggi” atau “metode absorbansi rendah” (Khaldun, 2018).

I.2.6 Instrumentasi spektrofotometer UV-VIS

Spektrometer atau spektrofotometer UV-VIS merupakan instrumen yang digunakan untuk mempelajari serapan atau emisi radiasi elektromagnetik sebagai fungsi dari panjang gelombang. Spektrofotometer terdiri atas komponen-komponen yang meliputi sumber tenaga radiasi yang stabil, sistem yang terdiri atas lensa-lensa, cermin, celah-celah dan lain-lain, monokromator untuk mengubah radiasi menjadi komponen-komponen panjang gelombang tunggal (monokromatik), kuvet yang merupakan tempat cuplikan senyawa yang akan dianalisis, detektor radiasi yang dihubungkan dengan sistem meter dan pencatat (Sastrohamidjojo, 2013).

1) Sumber tenaga radiasi

Sumber radiasi yang ideal untuk pengukuran serapan suatu senyawa harus menghasilkan spektrum yang kontinu dengan intensitas yang seragam pada keseluruhan kisaran panjang gelombang yang sedang dipelajari. Sumber radiasi sinar ultraviolet yang paling sering digunakan adalah lampu hidrogen dan lampu deuterium. Kedua lampu tersebut memiliki sepasang elektroda yang terselubung dalam tabung gelas dan diisi gas hidrogen atau deuterium pada tekanan yang rendah. Apabila tegangan dengan intensitas tinggi dikenakan pada elektroda-elektroda, maka akan menghasilkan elektron-elektron yang mengeksitasikan elektron-elektron lain dalam molekul gas ke tingkatan tenaga yang lebih tinggi. Apabila

elektron-elektron kembali ke tingkat dasar maka akan melepaskan radiasi yang kontinu pada daerah panjang gelombang sekitar 180 dan 350 nm. Selain itu, juga ada sumber radiasi ultraviolet yang lain yaitu lampu xenon, tetapi lampu ini tidak memiliki kestabilan yang sama dengan lampu hidrogen (Sastrohamidjojo, 2013).

2) Monokromator

Monokromator merupakan alat yang digunakan untuk mengurai radiasi polikromatik menjadi monokromatik. Monokromator merupakan serangkaian alat optik yang dapat digunakan untuk menguraikan radiasi polikromatik menjadi jalur-jalur dengan panjang gelombang tunggal (Sastrohamidjojo, 2013).

3) Kuvet

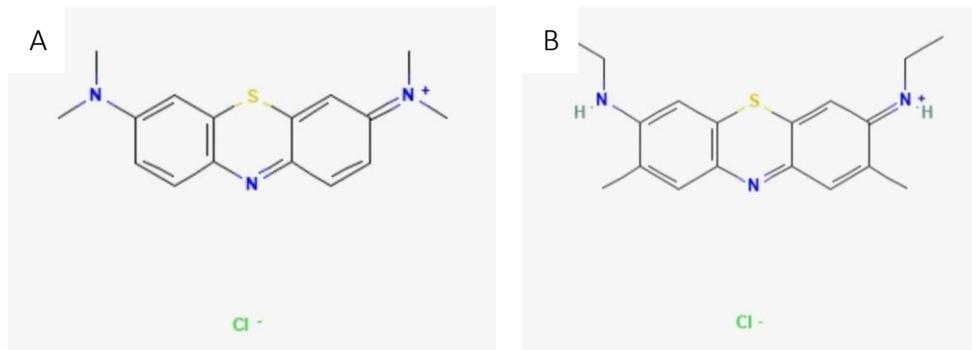
Kuvet merupakan tempat sampel atau senyawa yang berwujud gas atau larutan ketika akan dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Kuvet yang biasa digunakan untuk analisis pada daerah ultraviolet adalah *quartz* atau sel dari silika yang dilebur, sedangkan kuvet yang biasa digunakan untuk analisis pada daerah tampak adalah gelas biasa atau *quartz*. Kuvet yang digunakan untuk sampel atau senyawa yang berwujud gas mempunyai panjang 0,1-100 nm, sedangkan kuvet yang digunakan untuk sampel atau senyawa yang berwujud larutan mempunyai panjang 1-10 cm. Sebelum kuvet digunakan, sebaiknya dibersihkan terlebih dahulu dengan air atau dapat juga dicuci dengan larutan detergen atau asam nitrat panas untuk memaksimalkan hasil yang diperoleh (Sastrohamidjojo, 2013).

4) Detektor

Detektor akan menyerap energi foton yang mengenainya dan akan mengubahnya agar dapat diukur secara kuantitatif seperti sebagai arus listrik atau sebagai perubahan panas. Sebagian besar detektor akan menghasilkan sinyal listrik yang dapat mengaktifkan meter atau pencatat. Selanjutnya pencatat akan menghasilkan sinyal yang secara kuantitatif berkaitan dengan cahaya yang mengenainya. Detektor yang digunakan harus memenuhi syarat penting, yaitu memiliki sensitivitas yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi tenaga cahaya yang memiliki kekuatan rendah sekalipun, memiliki waktu repons yang pendek, memiliki stabilitas yang lama agar dapat menjadi respons secara kuantitatif dan memiliki sinyal elektronik yang mudah diperjelas. Detektor yang biasa digunakan dalam sinar ultraviolet dan sinar tampak adalah detektor fotolistrik (Sastrohamidjojo, 2013).

I.3 Perbedaan *New Methylene Blue* dan *Methylene Blue*

New methylene blue dan *methylene blue* memiliki struktur yang hampir sama. Pada *new methylene blue* memiliki dua gugus metil yang melekat langsung pada struktur aromatiknyanya (Bartlová et al., 2021). Struktur *new methylene blue* dan *methylene blue* dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Struktur A) *methylene blue*; B) *new methylene blue*

I.4 Validasi Metode Analisis

Menurut *United States Pharmacopeia* (USP) validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan akurat, spesifik, reproduksibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Berdasarkan hal tersebut, bisa disimpulkan bahwa validasi adalah aksi konfirmasi yang dilakukan untuk membuktikan bahwa metode analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan (Rohman, 2014).

Menurut *International Conference on Harmonization* (ICH), suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis. Suatu metode harus divalidasi ketika metode baru yang dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu, metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan dengan perkembangan atau karena terdapat masalah yang mengarah pada perevisian metode baku, adanya penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu, metode baku yang digunakan di laboratorium berbeda atau dikerjakan oleh analis yang berbeda atau

dikerjakan dengan alat yang berbeda, dan untuk mendemonstrasikan kesetaraan antara dua metode misalnya antara metode baru dan metode baku (Rohman, 2014).

I.4.1 Parameter validasi metode analisis

Ada delapan parameter yang dievaluasi untuk melakukan metode analisis menurut USP yaitu presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, linearitas dan rentang, kekasaran (*ruggedness*) dan ketahanan (*robustness*) (Rohman, 2014).

Menurut ICH parameter yang dievaluasi untuk melakukan metode analisis yaitu presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesivisitas, linearitas, kisaran (*range*), ketahanan (*robustness*), kesesuaian sistem (Rohman, 2014).

1) Akurasi

Akurasi adalah kedekatan antara nilai yang terukur (*measured value*) dengan nilai sebenarnya yang dapat diterima (*accepted true value*), baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, maupun nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sampel. Ada tiga metode pendekatan yang dapat digunakan ketika melakukan uji akurasi yaitu menggunakan SRM (*Standard Reference Material*), melakukan *spiking* terhadap plasebo dan menggunakan metode penambahan standar (*standard addition method*). Menurut ICH untuk menentukan akurasi sebaiknya dilakukan pengumpulan data dari 9 kali penetapan kadar dengan

3 konsentrasi yang berbeda dan masing-masing replikasi dianalisis 3 kali replikasi (Rohman, 2014).

2) Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation*, RSD). Nilai RSD sering disebut dengan koefisien variasi atau KV dari sejumlah pengukuran sampel yang dilakukan. Berdasarkan ICH, presisi yang dilakukan harus memiliki tiga tingkatan berbeda yaitu keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan ketertiruan (*reproducibility*) (Rohman, 2014).

Keterulangan merupakan presisi yang dilakukan pada kondisi percobaan yang sama dan dilakukan secara berulang, baik orangnya, peralatannya, tempatnya dan waktunya. Dua jenis pilihan pengujian yang telah diizinkan penggunaannya oleh ICH untuk mengetahui presisi keterulangan yaitu suatu pengukuran yang dilakukan sebanyak minimal 9 kali dan mencakup kisaran yang dilakukan dalam prosedur analisis, misalnya 3 konsentrasi yang berbeda dan masing-masing konsentrasi dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali. Pilihan kedua yaitu pengukuran dilakukan sebanyak minimal 6 kali pada konsentrasi 100% dari konsentrasi larutan uji (Rohman, 2014).

Presisi antara merupakan presisi yang dilakukan pada kondisi percobaan yang salah satunya berbeda, misalnya orangnya, peralatannya, tempatnya atau waktunya. Banyaknya presisi antara yang akan dilakukan

tergantung pada keadaan suatu prosedur yang akan diperluas. Parameter-parameter yang dapat diamati untuk presisi antara ini meliputi variasi antarhari, variasi analisis dan variasi peralatan. Pada pengujian presisi antara, sebaiknya dilakukan dengan rancangan percobaan (*experimental design*), tetapi hal tersebut juga tergantung dari banyaknya studi. Apabila dilakukan rancangan percobaan akan meminimalkan banyaknya percobaan yang harus dilakukan. ICH memperbolehkan tidak melakukan presisi antara jika analisis dapat membuktikan presisi dengan data reproduktibilitas. Nilai variabilitas dari presisi antara ini bergantung pada kisaran yang sama atau lebih kecil terhadap variabilitas keterulangan. ICH juga merekomendasikan pelaporan data simpangan baku (SD), simpangan baku relatif (RSD atau CV) dan interval kepercayaan data pada pengujian presisi antara (Rohman, 2014).

Reproduktibilitas merupakan presisi yang dilakukan pada kondisi percobaan dengan laboratorium yang berbeda. Parameter ini sebaiknya dipertimbangkan dalam standardisasi prosedur analisis. Uji presisi reproduktibilitas dilakukan dengan menggunakan sampel homogen yang sama dan desain percobaan yang sama tetapi pada laboratorium yang berbeda. Dalam kasus transfer metode antara dua laboratorium, dapat dilakukan pendekatan-pendekatan yang berbeda untuk memastikan suksesnya transfer produk analisis. Pendekatan yang paling sering digunakan adalah transfer metode secara langsung dari laboratorium asal ke laboratorium penerima (Rohman, 2014).

Laboratorium asal merupakan laboratorium yang mengembangkan dan memvalidasi prosedur analisis atau laboratorium yang telah disertifikasi lebih dahulu dalam prosedur analisis yang dimaksud dan akan berpartisipasi dalam studi transfer metode. Laboratorium penerima merupakan tempat prosedur analisis akan dipindahkan dan akan berpartisipasi dalam studi transfer metode. Apabila dilakukan metode transfer langsung sebaiknya ditulis protokol eksperimental secara terperinci serta kriteria keberterimaannya, misalnya perbedaan rata-rata antara dua laboratorium yang masih dapat diterima (Rohman, 2014).

Dokumentasi presisi yang dipersyaratkan oleh ICH yaitu simpangan baku, simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) dan kisaran kepercayaan. Pengujian presisi yang biasanya dilakukan saat awal validasi metode adalah keterulangan dan presisi antara. Reprodusibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antarlaboratorium. Presisi biasanya dinyatakan dengan simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatif (RSD) (Rohman, 2014).

3) Spesifisitas

Spesifisitas merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain yang terdapat dalam sampel, misalnya pengotor (*impurities*), produk degradasi, dan komponen matriks. ICH membagi spesifisitas dalam dua kategori, yaitu uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Uji identifikasi dilakukan untuk menunjukkan kemampuan

suatu metode analisis untuk membedakan antarsenyawa yang mempunyai struktur molekul yang hampir sama. Uji kemurnian dilakukan untuk menunjukkan daya pisah dua senyawa yang berdekatan (misalnya dalam kromatografi). Senyawa-senyawa tersebut biasanya komponen utama dan komponen aktif atau suatu pengotor. Jika dalam larutan uji yang digunakan terdapat pengotor (*impurities*), maka metode uji yang dilakukan tidak boleh terpengaruh dengan adanya pengotor ini (Rohman, 2014).

Uji spesifisitas dapat dilakukan dengan dua metode. Metode pertama yaitu dengan melakukan optimasi sehingga akan diperoleh kromatogram yang menggambarkan senyawa yang dituju terpisah sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi ≥ 2). Uji spesifisitas dengan metode ini ditentukan dengan cara membandingkan hasil-hasil uji dari suatu analisis sampel yang mengandung pengotor-pengotor, produk-produk degradasi, atau komponen-komponen plasebo dengan hasil-hasil yang diperoleh dari suatu analisis yang tidak mengandung pengotor-pengotor, produk-produk degradasi, atau komponen-komponen plasebo (Rohman, 2014).

Metode kedua yaitu dengan menggunakan detektor selektif. Misalnya detektor elektrokimia atau detektor fluoresen hanya akan mendeteksi senyawa tertentu sedangkan senyawa yang lain tidak akan terdeteksi. Penggunaan detektor UV-Vis pada panjang gelombang yang spesifik juga merupakan cara yang efektif untuk melakukan pengukuran selektivitas. Deteksi analit secara selektif dengan detektor UV-Vis dapat ditingkatkan

dengan menggunakan teknik derivatisasi yang spesifik terhadap derivat yang dihasilkan (Rohman, 2014).

4) Batas deteksi

Batas deteksi (*Limit of Detection*, LoD) merupakan suatu parameter yang digunakan untuk menggambarkan sensitivitas suatu metode analisis. Batas deteksi merupakan konsentrasi analit yang terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LoD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit tersebut ada di atas atau di bawah nilai tertentu. Defenisi batas deteksi yang paling umum adalah kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko ditambah dengan tiga simpangan baku blanko (Rohman, 2014).

5) Batas kuantifikasi

Batas kuantifikasi (*Limit of Quantification*, LoQ) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat diterima dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Rohman, 2014).

6) Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linearitas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan respons dengan konsentrasi. Uji linearitas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Kemudian data yang

diperoleh diproses dengan metode kuadrat terkecil, sehingga dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep dan koefisien korelasinya (Rohman, 2014).

Uji linearitas biasanya dilakukan secara langsung dengan mengencerkan larutan baku induk. Pada uji linearitas ini dianjurkan untuk melakukan pengenceran secara serial terhadap larutan baku induk. Apabila pengujian dilakukan dengan menggunakan berat baku yang berbeda akan menghasilkan kesalahan yang lebih besar terhadap kajian linearitas analit. Linearitas paling baik dievaluasi dengan pengamatan visual terhadap suatu *plot* yang menyatakan hubungan antara fungsi konsentrasi analit dengan sinyal yang diukur. Untuk melakukan uji linearitas sebaiknya digunakan minimal 5 konsentrasi yang berbeda (Rohman, 2014).

7) Kisaran

Kisaran (*range*) merupakan konsentrasi terendah dan tertinggi dari suatu analit yang menunjukkan akurasi, presisi dan linearitas yang dapat diterima. Kisaran-kisaran konsentrasi yang diuji tergantung pada jenis metode dan kegunaannya. Untuk pengujian komponen utama, sebaiknya konsentrasi baku diukur di dekat atau sama dengan konsentrasi kandungan analit yang diharapkan. Suatu strategi yang baik mengukur baku dengan kisaran 25, 50, 75, 100, 125 dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan (Rohman, 2014).

8) Kekasaran (*Ruggedness*)

Kekasaran atau *ruggedness* merupakan tingkat reproduisibilitas hasil yang diperoleh di bawah kondisi yang bermacam-macam dan diekspresikan sebagai persen simpangan baku relatif (%RSD). Kondisi-kondisi yang dimaksud yaitu perbedaan laboratorium yang digunakan, analisis, reagen yang digunakan dan waktu dilakukannya percobaan (Rohman, 2014).

Kekasaran suatu metode analisis mungkin tidak akan diketahui jika suatu metode yang digunakan baru dikembangkan pertama kali. Kekasaran suatu metode akan terlihat apabila metode tersebut telah digunakan berulang kali. Suatu pengembangan metode yang bagus mensyaratkan suatu evaluasi yang sistematis terhadap faktor-faktor penting yang memengaruhi kekasaran suatu metode (Rohman, 2014).

Ada beberapa jenis strategi yang dapat digunakan untuk menentukan kekasaran suatu metode analisis, tergantung pada kompleksitas metode dan waktu yang tersedia untuk melakukan validasi (Rohman, 2014).

9) Ketahanan (*Robustness*)

Ketahanan merupakan kapasitas suatu metode analisis untuk tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode, misalnya persentase pelarut organik, pH, kekuatan ionik, suhu dan sebagainya. Uji ketahanan yang baik dapat dilakukan dengan

memvariasikan parameter-parameter penting dalam suatu metode secara sistematis, lalu mengukur pengaruhnya pada pemisahan (Rohman, 2014).

10) Stabilitas

Agar diperoleh hasil-hasil yang reproduibel dan reliabel, sampel, reagen dan baku yang digunakan harus stabil pada waktu tertentu (tergantung waktu yang dibutuhkan selama proses analisis). Stabilitas semua larutan dan reagen sangat penting, baik yang berkaitan dengan suhu maupun yang berkaitan dengan waktu. Jika larutan yang digunakan tidak stabil pada suhu kamar, maka dapat dilakukan penurunan suhu untuk meningkatkan stabilitas sampel dan standar yang digunakan (Rohman, 2014).

11) Kesesuaian sistem

Sebelum dilakukan proses analisis, seorang analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan dapat memberikan data yang dapat diterima. Hal tersebut dapat dilakukan dengan percobaan kesesuaian sistem yang didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan-persyaratan kesesuaian sistem biasanya dilakukan setelah pengembangan metode dan validasi metode (Rohman, 2014).

Farmakope Amerika (*United States Pharmacopeia*, USP) menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi jumlah lempeng teori (N), faktor *tailing*, kapasitas (k' atau α), dan nilai

simpangan baku relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Pada umumnya, paling tidak ada dua kriteria yang biasanya dipersyaratkan untuk menunjukkan kesesuaian sistem suatu metode. Nilai RSD tinggi puncak atau luas puncak dari lima kali injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika nilai $RSD \leq 1\%$ untuk lima kali injeksi. Sementara untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika antara 5-15% (Rohman, 2014).