

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Minyak Atsiri

2.1.1. Pengertian Minyak Atsiri

Minyak atsiri adalah zat berbau yang terkandung dalam tanaman. Minyak ini disebut juga minyak menguap, minyak eteris, minyak esensial karena pada suhu kamar mudah menguap. Istilah esensial dipakai karena minyak atsiri mewakili bau dari tanaman asalnya. Dalam keadaan segar dan murni, minyak atsiri umumnya tidak berwarna. Namun, pada penyimpanan lama minyak atsiri dapat teroksidasi. Untuk mencegahnya, minyak atsiri harus disimpan dalam bejana gelas yang berwarna gelap, diisi penuh, ditutup rapat, serta disimpan di tempat yang kering dan sejuk.

Proses produksi minyak atsiri dapat ditempuh melalui 3 cara, yaitu:

- (1) pengempaan (*pressing*)
- (2) ekstraksi menggunakan pelarut (*solvent extraction*)
- (3) penyulingan (*distillation*).

Penyulingan merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk mendapatkan minyak atsiri. Penyulingan dilakukan dengan mendidihkan bahan baku di dalam ketel suling sehingga terdapat uap yang diperlukan untuk memisahkan minyak atsiri dengan cara mengalirkan uap jenuh dari ketel pendidih air (*boiler*) ke dalam ketel penyulingan.

(Naibaho, 2010)

2.1.2. Minyak Jahe

Minyak jahe adalah suatu campuran yang kompleks dari komponen terpenes dan non terpenoid. komponen utama minyak atsiri jahe yang menyebabkan bau harum adalah zingiberen dan zingiberol. Zingiberen merupakan seskuiterpen hidrokarbon dengan rumus $C_{15}H_{24}$, sedangkan zingiberol merupakan seskuiterpen alkohol dengan rumus $C_{15}H_{26}O$.

(Koswara ,1995)

2.1.3 Jahe dan Komposisinya

Klasifikasi Ilmiah

- Divisi : Spermatophyta.
- Sub-divisi : Angiospermae.
- Kelas : Monocotyledoneae.
- Ordo : Zingiberales.
- Famili : Zingiberaceae.
- Genus : Zingiber.
- Species : *Zingiber officinale*

Jahe atau zingiber officinale merupakan salah satu tanaman berupa tumbuhan rumpun berbatang semu. Jahe adalah tanaman rimpang yang sangat populer dikalangan masyarakat baik sebagai bahan rempah dapur ataupun bahan obat.

a. Morfologi tanaman jahe

Ciri morfologisnya bisa diurai sebagai tanaman obat yang dilengkapi dengan bunga dan juga biji tunggal. Akar jahe dalam bentuk rimpang atau umbi. Uniknya, meski digolongkan sebagai tumbuhan magnolophhyta, pada

faktanya jahe lebih banyak dikembangkan melalui rimpangnya ketimbang dengan bunga dan bijinya. Bagian jahe yang dimanfaatkan adalah rimpang. Hal ini wajar sebab bagian tersebutlah yang memiliki kandungan senyawa kompleks seperti oleoresin (gingerol, shogaol, paradol, zingireone dan lain-lain) serta minyak atsiri.

Batang jahe merupakan batang semu dengan tinggi 30 hingga 100 cm. Akarnya berbentuk rimpang dengan daging akar berwarna kuning hingga kemerahan dengan bau menyengat. Daun menyirip dengan panjang 15 hingga 23 mm dan panjang 8 hingga 15 mm. Tangkai daun berbulu halus.

Bunga jahe tumbuh dari dalam tanah berbentuk bulat telur dengan panjang 3,5 hingga 5 cm dan lebar 1,5 hingga 1,75 cm. Gagang bunga bersisik sebanyak 5 hingga 7 buah. Bunga berwarna hijau kekuningan. Bibir bunga dan kepala putik ungu. Tangkai putik berjumlah dua.

Habitat jahe tumbuh subur diketinggian 0 hingga 1500 meter di atas permukaan laut, kecuali jenis jahe gajah di ketinggian 500 hingga 950 meter.

b. Jenis Jahe

Jahe dibedakan menjadi tiga jenis berdasarkan ukuran, bentuk dan rimpangnya.

- 1) Jahe putih atau jahe kuning besar yang disebut juga jahe gajah atau jahe badak.
- 2) Jahe putih atau kuning kecil yang disebut juga dengan jahe suntil atau jahe emprit. Ruasnya kecil, agak rata sampai agak menggembung. jahe ini bisa dipanen setelah berumur tua.
- 3) Jahe merah. Rimpangnya berwarna merah dan lebih kecil daripada jahe putih kecil, jahe merah selalu dipanen setelah berumur tua. Jahe ini memiliki

kandungan minyak atsiri paling tinggi dibandingkan dengan 2 klon lainnya, sehingga cocok untuk ramuan obat - obatan.

(Bangun, 2011)

c. Gambar Tanaman Jahe



Gambar 1. Jahe

d. Komposisi Minyak Atsiri Jahe

Rimpang Jahe sebagian besar tersusun atas :

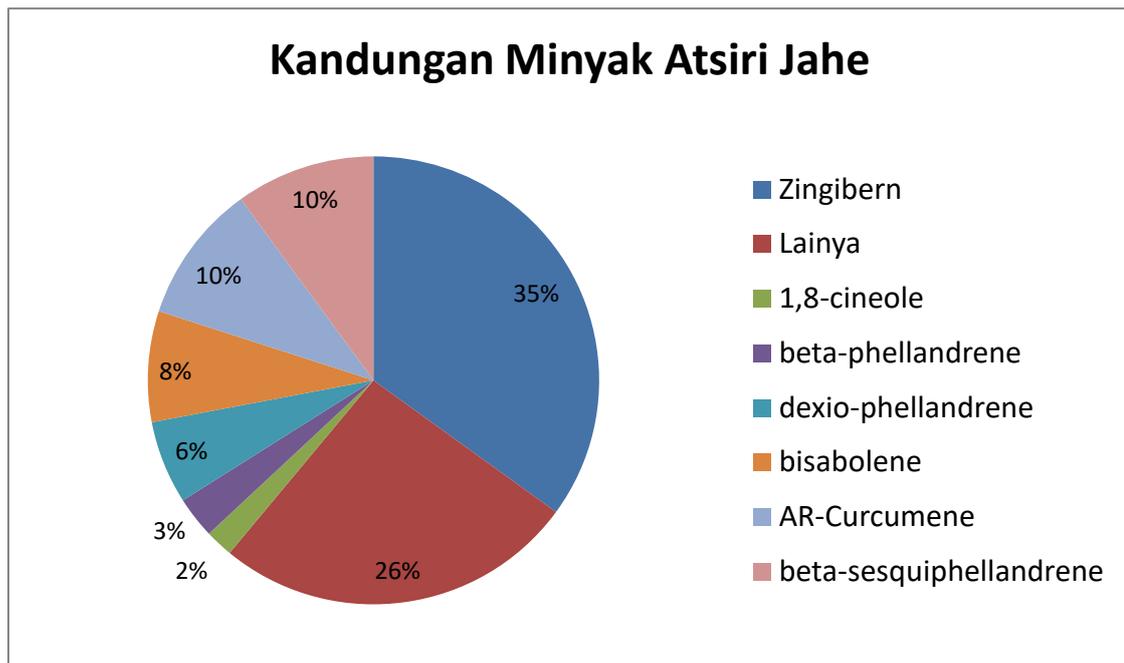
Tabel 1. Kandungan Jahe

No	Kandungan Rimpang Jahe	Kadar
1	Pati	40-60%
2	Protein	9-10%
3	Lipid	6-10%
4	Oleoresins	4-7,5%
5	Minyak Atsiri	1-3,3%

(Evans,2002)

Rimpang jahe mengandung minyak atsiri Jahe yang terdiri dari senyawa-senyawa seskuiterpen, zingiberene, zingeron, oleoresin, camphena, limonen, borneol, sineol, sitral, zingiberal, Phelandrene. Kandungan utama minyak jahe adalah zingiberene dengan total kandungan 30% – 35% dari total minyak

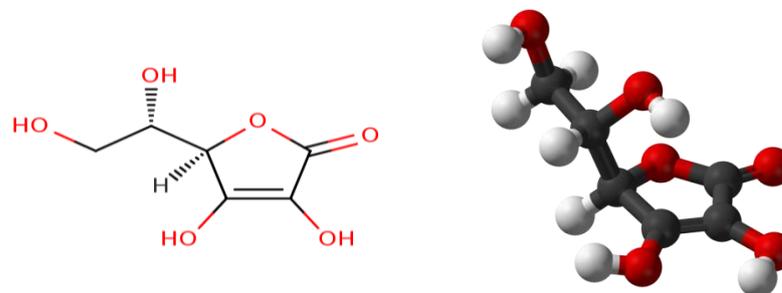
atsiri. Senyawa ini juga mempengaruhi kualitas yang dihasilkan. Perbedaan perlakuan antara bahan baku basah dan kering juga berakibat pada kandungan kimia yang berbeda pula. Pada bahan baku kering ditemukan Zingiberene dan Curcumen sedangkan pada jahe empit basah/segar tidak didapati Curcumen.



Gambar 2. Kandungan Minyak Atsiri Jahe

(Evans,2002)

2.2 Asam Askorbat (Vitamin C)



Gambar 3. Struktur Asam Askorbat

Asam Askorbat ($C_6H_8O_6$) adalah suatu senyawa kimia yang disebut vitamin C, selain asam dehidroaskorbat. Ia berbentuk bubuk Kristal kuning keputihan yang larut dalam air dan memiliki sifat-sifat antioksidan. Nama Asam askorbat berasal dari kata a- (tanpa) dan scorbutus (skurvi). (Anonim, 2017).

Suatu Asam askorbat bersifat asam di alam. Asam askorbat suatu senyawa kimia organik dengan fungsi polihidroksi yang memberikan sifat antioksidan. Oleh karena itu, asam askorbat digunakan juga sebagai aditif antioksidan makanan. Sifat antioksidan pada asam askorbat tersebut berasal dari gugus hidroksil dari nomor C2 dan 3 yang mendonorkan ion H^+ bersama-sama dengan elektronnya menuju ke berbagai senyawa oksidan seperti radikal bebas dengan gugus oksigen atau nitrogen, peroksida dan superoksida. Pada Sitoplasma Asam Askorbat memiliki kadar Fe yang tinggi, sehingga asam askorbat dapat bersifat pro-oksidan oleh karena reaksi redoks Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} yang mencetuskan senyawa superoksida dan pada akhirnya menjadi radikal bebas dengan gugus hidroksil yang sangat reaktif (Barina, 2004).

Sifat sifat Asam Askorbat adalah :

1. Padatan Berwarna putih kekuningan
2. Massa Molar $176,12 \text{ gmol}^{-1}$
3. Densitas $1,65 \text{ g/cm}^3$
4. Titik Lebur (Dekomposisi) :

-Kelarutan dalam air $33 \text{ g} / 100 \text{ mL}$

-Kelarutan dalam etanol $2 \text{ g} / 100 \text{ mL}$

-Kelarutan dalam gliserol $1 \text{ g}/100 \text{ mL}$

-Kelarutan dalam propilena glikol $5 \text{ g}/100 \text{ mL}$

-Kelarutan dalam solvent tak larut dalam dietil eter, kloroform, benzene, minyak dan lemak

5. Keasaman (pKa) 4,10 -11,6
6. Massa jenis cair pada titik lebur $1,65 \text{ g/cm}^3$

(Anonim, 2017)

2.3 Spektrofotometri

Spektrofotometer sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Kelebihan spektrometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat terseleksi dan ini diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating ataupun celahoptis. (Khopkar, 2002)

Panjang gelombang yang digunakan adalah panjang gelombang optimum yakni panjang gelombang yang memberikan nilai absorbansi maksimum dan nilai transmitansi minimum. Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal dikarenakan pada panjang gelombang maksimal maka kepekaannya juga maksimal karena perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar. Di sekitar panjang gelombang maksimal, bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum Lambert Beer akan terpenuhi. Jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali, ketika digunakan panjang gelombang maksimum

2.3.1 Prinsip Kerja Metode Spektrofotometri

Bila cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian diserap dalam medium itu, dan sisanya diteruskan. Jika intensitas sinar masuk dinyatakan oleh $I_0 = I_a + I_t + I_r$

Dimana : I_0 = intensitas sinar masuk

I_a = intensitas sinar terserap

I_t = intensitas sinar diteruskan

I_r = intensitas sinar terpantulkan

2.3.2 Jenis Spektrofotometri dan Mekanisme Kerja

1. Spektrofotometri Visible

Pada spektrofotometri ini yang digunakan sebagai energi adalah sinar cahaya tampak dengan λ 380-750 nm. Cara kerja dari spektrofotometri ini adalah sampel yang akan dianalisa harus memiliki warna. Oleh sebab itu, untuk sampel yang tidak berwarna harus terlebih dahulu diberi warna dengan reagen spesifik yang akan memberi warna pada senyawa.

2. Spektrofotometri UV

Spektrofotometri UV berdasarkan interaksi sampel dengan sinar UV yang memiliki λ 190-380 nm. Area sinar UV tidak bisa dideteksi oleh mata kita maka senyawa yang dapat menyerap sinar ini terkadang merupakan senyawa yang tidak memiliki warna, bening, dan transparan. Oleh sebab itu, maka sampel yang tidak berwarna tidak perlu dibuat berwarna dengan penambahan reagen tertentu. Namun perlu diingat

bahwa sampel yang keruh harus dibuat bening dulu dengan filtrasi atau centrifugasi.

3. Spektrofotometri UV/VIS

Merupakan gabungan antara spektrofotometri visual dan V karena menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda. Sehingga dapat digunakan baik untuk sampel berwarna maupun sampel tidak berwarna.

4. Spektrofotometri IR (Inframerah)

Cahaya inframerah terbagi menjadi inframerah dekat, pertengahan, dan jauh. Inframerah pada spektrofotometri adalah inframerah jauh dan inframerah pertengahan yang mempunyai panjang gelombang kira-kira 2,5-1000 μm . Umumnya pada spektrofotometri IR digunakan dalam analisa kualitatif, biasanya digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa terutama senyawa organik. Hasil analisa biasanya berupa signal kromatogram hubungan intensitas IR terhadap panjang gelombang.

2.4 Spektrofotometri Visible

Spektrofotometri visible disebut juga spektrofotometri sinar tampak. Yang dimaksud sinar tampak adalah sinar yang dapat dilihat oleh mata manusia. Cahaya yang dapat dilihat oleh mata manusia adalah cahaya dengan panjang gelombang 400-800 nm dan memiliki energi sebesar 299–149 kJ/mol. Elektron pada keadaan normal atau berada pada kulit atom dengan energi terendah disebut keadaan dasar (ground-state). Energi yang dimiliki sinar tampak mampu membuat elektron tereksitasi dari keadaan dasar menuju kulit atom yang memiliki

energi lebih tinggi atau menuju keadaan tereksitasi. Cahaya atau sinar tampak adalah radiasi elektromagnetik yang terdiri dari gelombang. Seperti semua gelombang, kecepatan cahaya, panjang gelombang dan frekuensi dapat didefinisikan sebagai:

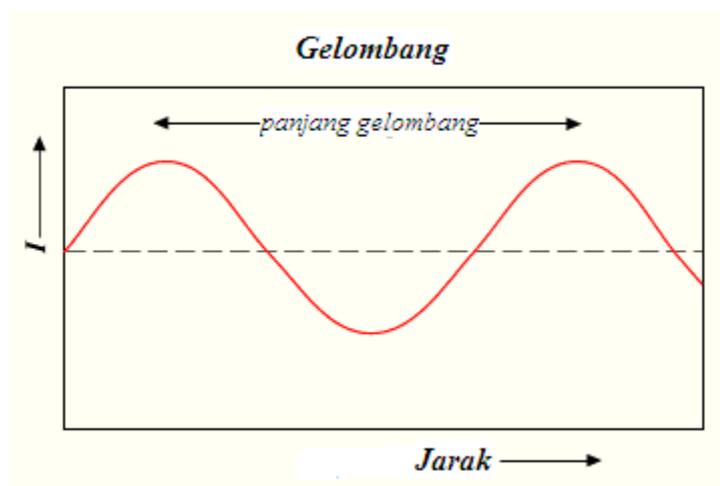
$$C = V \cdot \lambda$$

Dimana:

C = Kecepatan cahaya

V = Frekuensi dalam gelombang per detik (Hertz)

λ = Panjang gelombang dalam meter



Gambar 4. Radiasi Elektromagnetik dengan panjang gelombang λ

Benda bercahaya seperti matahari atau bohlam listrik memancarkan spectrum lebar yang tersusun dari panjang gelombang. Panjang gelombang yang dikaitkan dengan cahaya tampak itu mampu mempengaruhi selaput pelangi manusia yang mampu menimbulkan kesan subyektif akan ketampakan (visible). (A.L.Underwood dan R.A.Day Jr, 1981)

Cahaya /sinar tampak terdiri dari suatu bagian sempit kisaran panjang gelombang dari radiasi elektromagnetik dimana mata manusia sensitive. Radiasi

dari panjang gelombang yang berbeda ini dirasakan oleh mata kita sebagai warna berbeda, sedangkan campuran dari semua panjang gelombang tampak seperti sinar putih. Sinar putih memiliki panjang gelombang mencakup 380-750 nm.

Panjang gelombang dari berbagai warna adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Serapan Sinar dan Zat Warna

λ (nm)	Warna yang Diteruskan	Warna yang Diserap
400-435	Ungu	Hijau – Kekuningan
435-480	Biru	Kuning
480-490	Biru-Kehijauan	Jingga
490=500	Hijau-Kebiruan	Merah
500-560	Hijau	Ungu Kemerahan
560-580	Hijau-Kekuningan	Ungu
580-595	Kuning	Biru
595-610	Jingga	Biru Kehijauan
610-750	Merah	Hijau Kebiruan

(Sumber: Underwood, 2002)

2.6 Hukum Lambert – Beer

Menurut Hukum Lambert, serapan berbanding lurus terhadap ketebalan sel (b) yang disinari, dengan bertambahnya sel, maka serapan akan bertambah.

$$A = k \cdot b$$

Menurut Beer, yang berlaku untuk radiasi monokromatis dalam larutan yang sangat encer, serapan berbanding lurus dengan konsentrasi.

$$A = k \cdot c$$

Jika konsentrasi bertambah, jumlah molekul yang dilalui berkas sinar akan bertambah, sehingga serapan juga bertambah. Kedua persamaan ini digabungkan dalam Hukum Lambert-Beer, maka diperoleh bahwa serapan berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan sel yang dapat ditulis dengan persamaan:

$$A = k.c.b$$

Umumnya digunakan dua satuan c (konsentrasi zat yang menyerap) yang berlainan, yaitu gram per liter atau mol per liter. Nilai tetapan (k) dalam hukum Lambert-Beer tergantung pada sistem konsentrasi mana yang digunakan. Bila c dalam gram per liter, tetapan disebut dengan absorptivitas (a) dan bila dalam mol per liter, tetapan tersebut adalah absorptivitas molar (ϵ).

Jadi dalam sistem dikombinasikan, hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dalam rumus berikut:

$$A = a.b.c \text{ (g/liter) atau } A = \epsilon . b . c \text{ (mol/liter)}$$

Dimana:

A = serapan

a = absorptivitas

b = ketebalan sel

c = konsentrasi

ϵ = absorptivitas molar

Hukum Lambert-Beer menjadi dasar aspek kuantitatif spektrofotometri dimana konsentrasi dapat dihitung berdasarkan rumus di atas. Absorptivitas (a) merupakan konstanta yang tidak tergantung pada konsentrasi, tebal kuvet dan

intensitas radiasi yang mengenai larutan sampel. Absorptivitas tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang radiasi (Day and Underwood, 1999)

Menurut Roth dan Blaschke (1981), absorptivitas spesifik juga sering digunakan untuk menggantikan absorptivitas. Harga ini, memberikan serapan larutan 1 % (b/v) dengan ketebalan sel 1 cm, sehingga dapat diperoleh persamaan:

$$A = A^1_1 \cdot b \cdot c$$

Dimana:

A^1_1 = absorptivitas spesifik

b = ketebalan sel

c = konsentrasi senyawa terlarut (g/100ml larutan)

2.7 Proses Absorpsi Cahaya pada Spektrofotometri

Ketika cahaya dengan panjang berbagai panjang gelombang (cahaya polikromatis) mengenai suatu zat, maka cahaya dengan panjang gelombang tertentu saja yang akan diserap. Di dalam suatu molekul yang memegang peranan penting adalah elektron valensi dari setiap atom yang ada hingga terbentuk suatu materi. Elektron-elektron yang dimiliki oleh suatu molekul dapat berpindah (eksitasi), berputar (rotasi) dan bergetar (vibrasi) jika dikenai suatu energi.

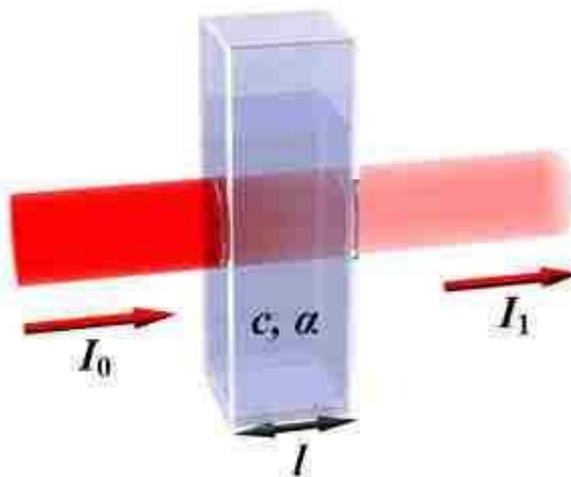
Jika zat menyerap cahaya tampak dan ultraviolet maka akan terjadi perpindahan elektron dari keadaan dasar menuju ke keadaan tereksitasi. Perpindahan elektron ini disebut transisi elektronik. Apabila cahaya yang diserap adalah cahaya inframerah maka elektron yang ada dalam atom atau elektron

ikatan pada suatu molekul dapat hanya akan bergetar (vibrasi). Sedangkan gerakan berputar elektron terjadi pada energi yang lebih rendah lagi misalnya pada gelombang radio.

Atas dasar inilah spektrofotometri dirancang untuk mengukur konsentrasi yang ada dalam suatu sampel. Dimana zat yang ada dalam sel sampel disinari dengan cahaya yang memiliki panjang gelombang tertentu. Ketika cahaya mengenai sampel sebagian akan diserap, sebagian akan dihamburkan dan sebagian lagi akan diteruskan.

Pada spektrofotometri, cahaya datang atau cahaya masuk atau cahaya yang mengenai permukaan zat dan cahaya setelah melewati zat tidak dapat diukur, yang dapat diukur adalah I_t/I_0 atau I_0/I_t (perbandingan cahaya datang dengan cahaya setelah melewati materi (sampel)).

Proses penyerapan cahaya oleh suatu zat dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 5. Proses Penyerapan Cahaya

Gambar Proses penyerapan cahaya oleh zat dalam sel sampel. dari gambar 2 terlihat bahwa zat sebelum melewati sel sampel lebih terang atau lebih banyak di banding cahaya setelah melewati sel sampel. Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang hamburkan diukur sebagai transmitansi (T), dinyatakan dengan hukum lambert-beer atau Hukum Beer, berbunyi: "jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan".

Berdasarkan hukum Lambert-Beer, rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang dihamburkan:

$$T = I_t/I_0 \quad \text{atau} \quad \% T = (I_t/I_0) \times 100 \%$$

Dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = -\log I_t/I_0$$

Dimana :

I_0 merupakan intensitas cahaya datang

I_t atau I_1 adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel

Spektrofotometer modern dikalibrasi secara langsung dalam satuan absorbansi. (Dalam beberapa buku lama $\log I_0/I$ disebut densitas optik dan I digunakan sebagai ganti simbol P). Perbandingan I/I_0 disebut transmitansi(T), dan beberapa instrumen disajikan dalam % transmitansi, $(I/I_0) \times 100$. Sehingga hubungan absorbansi dan transmitansi dapat ditulis sebagai:

$$A = -\log T$$

Dengan menggunakan beberapa instrumen, hasil pengukuran tercatat sebagai % transmitansi dan absorbansi dihitung dengan menggunakan rumus

tersebut. Dari pembahasan di atas dapat dikatakan bahwa konsentrasi dari suatu unsur berwarna harus sebanding dengan intensitas warna larutan. Ini adalah dasar pengukuran yang menggunakan pembandingan visual di mana intensitas warna dari suatu larutan dari suatu unsur yang konsentrasinya tidak diketahui dibandingkan dengan intensitas warna dari sejumlah larutan yang diketahui konsentrasinya. (Kusnanto Mukti, 2012)

Secara eksperimen hukum Lambert-beer akan terpenuhi apabila peralatan yang digunakan memenuhi kriteria-kriteria berikut:

1. Sinar yang masuk atau sinar yang mengenai sel sampel berupa sinar dengan dengan panjang gelombang tunggal (monokromatis).
2. Penyerapan sinar oleh suatu molekul yang ada di dalam larutan tidak dipengaruhi oleh molekul yang lain yang ada bersama dalam satu larutan.
3. Penyerapan terjadi di dalam volume larutan yang luas penampang (tebal kuvet) yang sama.
4. Penyerapan tidak menghasilkan pemancaran sinar pendafluor. Artinya larutan yang diukur harus benar-benar jernih agar tidak terjadi hamburan cahaya oleh partikel-partikel koloid atau suspensi yang ada di dalam larutan.
5. Konsentrasi analit rendah. Karena apabila konsentrasi tinggi akan mengganggu kelinearan grafik absorbansi versus konsentrasi.

2.8 Peralatan untuk Spektrofotometri

Dalam analisis spektrofotometri digunakan suatu sumber radiasi yang masuk ke dalam daerah spektrum ultraviolet itu. Dari spektrum ini, dipilih

panjang-panjang gelombang tertentu dengan lebar pita kurang dari 1 nm. Proses ini menggunakan instrumen yang disebut spektrofotometer. Alat ini terdiri dari spektrometer yang menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer sebagai alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi.

Unsur -unsur terpenting suatu spektrofotometer adalah sebagai berikut:

1. Sumber-sumber lampu: lampu deuterium digunakan untuk daerah UV pada panjang gelombang dari 190-350 nm, sementara lampu halogen kuarsa atau lampu tungsten digunakan untuk daerah visibel pada panjang gelombang antara 350- 900 nm.
2. Monokromotor: digunakan untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis. Alatnya dapat berupa prisma maupun grating. Untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diinginkan dari hasil penguraian.
3. Kuvet (sel): digunakan sebagai wadah sampel untuk menaruh cairan ke dalam berkas cahaya spektrofotometer. Kuvet itu haruslah meneruskan energi radiasi dalam daerah spektrum yang diinginkan. Pada pengukuran di daerah tampak, kuvet kaca atau kuvet kaca corex dapat digunakan, tetapi untuk pengukuran pada daerah ultraviolet harus menggunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Kuvet tampak dan ultraviolet yang khas mempunyai ketebalan 1 cm, namun tersedia kuvet dengan ketebalan yang sangat beraneka, mulai dari ketebalan kurang dari 1 mm sampai 10 cm bahkan lebih.
4. Detektor: berperan untuk memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang.

5. Suatu amplifier (penguat) dan rangkaian yang berkaitan yang membuat isyarat listrik itu dapat dibaca.
6. Sistem pembacaan yang memperlihatkan besarnya isyarat listrik (Day and Underwood, 1981).

2.9 Validasi Metode Analisis

Validasi metode adalah suatu proses yang menunjukkan bahwa prosedur analitik telah sesuai dengan penggunaan yang dikehendaki. Validasi metode analisis ditujukan untuk menjamin bahwa metode analisis memenuhi spesifikasi yang dapat diterima sesuai dengan tujuan yang diharapkan. Hal ini perlu dilakukan untuk menjamin bahwa setiap pengukuran serupa yang dilakukan di masa yang akan datang akan menghasilkan nilai terhitung (calculated value) yang cukup dekat atau sama dengan nilai sebenarnya dari jumlah analit yang terdapat dalam sampel. Adapun karakteristik dalam validasi yaitu akurasi/kecermatan, presisi/keseeksamaan, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantitasi, linieritas, rentang, kekasaran dan ketahanan (robustness) (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.9.1 Akurasi (Kecermatan)

Akurasi adalah kedekatan antara nilai hasil uji yang diperoleh melalui metode analitik dengan nilai sebenarnya. Untuk pengujian senyawa obat akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (stadar reference material, SRM). Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% recovery).

Akurasi dapat ditentukan dengan tiga cara yaitu:

- ✓ membandingkan hasil analisis dengan CRM (certified reference material) dari organisasi standar internasional
- ✓ spiked – placebo recovery
- ✓ standard addition method

(Gandjar dan Rohman, 2012).

Placebo recovery atau metode simulasi, analit murni ditambahkan (spiked) ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi, lalu campuran tersebut dianalisis dan jumlah analit hasil analisis dibandingkan dengan jumlah analit teoritis yang diharapkan. Jika placebo tidak memungkinkan untuk disiapkan, maka sejumlah analit yang telah diketahui konsentrasinya dapat ditambahkan langsung ke dalam sediaan farmasi. Metode ini dinamakan standard addition method atau metode penambahan baku.

2.9.2 Presisi (Keseksamaan)

Presisi dari suatu metode analisis adalah derajat kesesuaian di antara masing-masing hasil uji, jika prosedur analisis diterapkan berulang kali pada sejumlah cuplikan yang diambil dari satu sampel homogen. Presisi dinyatakan sebagai deviasi standar atau deviasi standar relatif (koefisien variasi). Presisi dapat diartikan pula sebagai derajat keterulangan dari prosedur analisis pada kondisi kerja normal (Satiadarma, dkk., 2004).

Presisi ditentukan dengan menggunakan sejumlah alikot secukupnya dari satu sampel homogen, agar dapat dihitung secara statistik perkiraan deviasi standar atau deviasi standar yang sah. Pada uji tersebut setiap cuplikan mendapatkan perlakuan analisis yang sama, lengkap dan mandiri, mulai dari

persiapannya sampai dengan didapatkan hasil akhirnya (Satiadarma, dkk., 2004).

Sesuai dengan ICH, presisi dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu:

- keterulangan (repeatability),
- presisi antara (intermediate precision), dan
- ketertiruan (reproducibility).

Keterulangan yakni presisi pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya. Presisi seringkali diekspresikan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari

serangkaian data. Nilai RSD dirumuskan dengan:
$$RSD = \frac{100 \times SD}{\bar{X}}$$
 yang mana merupakan rata – rata data, dan SD adalah standar deviasi serangkaian data.

Sementara nilai SD dihitung dengan rumus:
$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{X})^2}{(N-1)}}$$
 yang mana X adalah nilai dari masing – masing pengukuran; \bar{X} adalah rata – rata dari pengukuran; N adalah banyaknya data. Biasanya replikasi dilakukan 6-15 kali dilakukan pada sampel tunggal untuk tiap konsentrasi (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.9.3 Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradatif dan komponen matriks. Secara umum, spesifisitas dapat ditunjukkan oleh pendekatan secara langsung maupun tidak

langsung. Pendekatan langsung dapat ditunjukkan oleh minimalnya gangguan oleh senyawa lain terhadap hasil analisis misalnya mendapatkan hasil yang sama dengan atau tanpa senyawa pengganggu, resolusi kromatografik yang bagus dan kemurnian puncak (peak purity). Pendekatan tidak langsung adalah lewat pengamatan karakteristik akurasi dari metode tersebut. Bila akurasi metode telah dapat diterima (acceptable) dan valid, maka metode tersebut otomatis telah masuk kriteria sebagai metode yang spesifik (Ermer dan McB Miller, 2005).

2.9.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Limit deteksi dari suatu metode analisis adalah nilai parameter uji batas yaitu konsentrasi analit terendah yang masih dapat dideteksi. Limit kuantitasi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi eksperimen yang ditentukan. LOD dan LOQ dapat dihitung dengan rumus:

$$\checkmark \text{ LOD} = 3,3(\text{SD}/ S)$$

$$\checkmark \text{ LOQ} = 10(\text{SD}/S)$$

Dimana: SD : standard deviasi S : kemiringan (slope)

(Gandjar dan Rohman, 2012).

2.9.5 Linearitas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas dapat ditentukan secara langsung dengan pengukuran sampel (analit) yang ditambahkan baku pada sekurang-kurangnya lima titik

konsentrasi yang mencakup seluruh rentang konsentrasi kerja (Ermer dan McB Miller, 2005).

Linearitas paling baik dievaluasi dengan pengamatan visual terhadap suatu plot yang menyatakan hubungan antara fungsi konsentrasi analit dengan signal yang diukur (absorbansi, luas puncak, tinggi puncak, area di bawah kurva dsb). Pada uji linearitas, paling tidak 6 konsentrasi yang berbeda digunakan pada uji. Pada keadaan normal, linearitas diperoleh ketika nilai koefisien determinasi (r^2) $\geq 0,997$ dan yang kurang diterima ketika $r^2 < 0,997$ (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.9.6 Rentang

Rentang adalah konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analitik menunjukkan akurasi, presisi dan linieritas yang mencukupi. Rentang suatu prosedur dapat divalidasi lewat pembuktian bahwa prosedur analitik tersebut mampu memberikan presisi, akurasi dan linieritas yang dapat diterima ketika digunakan untuk menganalisis sampel (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.9.7 Kekuatan (Ketahanan)

Kekuatan merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter – parameter metode seperti: persentase pelarut organik, PH, kekuatan ionik, suhu dan sebagainya (Gandjar dan Rohman, 2012).

