

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. SUPLEMEN MAKANAN (2)

Berdasarkan Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan No. 00.05.23.3644 Tahun 2004, suplemen makanan adalah produk yang dimaksudkan untuk melengkapi kebutuhan zat gizi makanan, mengandung satu atau lebih bahan berupa vitamin, mineral, asam amino atau bahan lain (berasal dari tumbuhan atau bukan tumbuhan) yang mempunyai nilai gizi dan atau efek fisiologis dalam jumlah terkonsentrasi.

Pada keputusan tersebut dalam pasal 4 menyatakan persyaratan bahwa suplemen makanan harus memiliki kriteria sebagai berikut:

1. Menggunakan bahan yang memenuhi standar mutu dan persyaratan kemasan serta standar dan persyaratan lain yang ditetapkan;
2. Kemanfaatan yang dinilai dari komposisi dan atau didukung oleh data pembuktian;
3. Diproduksi dengan menerapkan Cara Pembuatan yang Baik;
4. Penandaan yang harus mencantumkan informasi yang lengkap, obyektif, benar dan tidak menyesatkan;

5. Dalam bentuk sediaan pil, tablet, kapsul, serbuk, granul dan cairan yang tidak dimaksud untuk pangan.

Dalam keputusan yang sama juga dicantumkan hal-hal yang dilarang dalam suatu suplemen makanan, yaitu sebagai berikut:

1. Suplemen makanan dilarang mengandung bahan yang tergolong obat atau narkotika atau psikotropika sesuai ketentuan yang berlaku.
2. Suplemen makanan dilarang mengandung bahan yang melebihi batas maksimum sebagaimana yang dicantumkan oleh BPOM.
3. Suplemen makanan dilarang menggunakan tumbuhan dan atau hewan yang dilindungi sesuai dengan ketentuan yang berlaku.
4. Suplemen makanan dalam bentuk cairan per oral dilarang mengandung etil alkohol dengan kadar lebih dari 5 (lima) %.

B. PSIKOTROPIKA DAN PENGGOLONGANNYA(10)

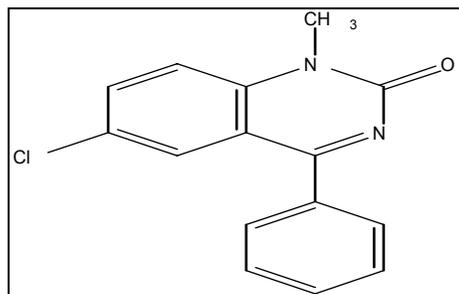
Berdasarkan UU RI No.5 Tahun 1997 tentang psikotropika disebutkan bahwa psikotropika adalah zat atau obat, baik alamiah maupun sintetis bukan narkotika, yang berkhasiat psikoaktif melalui pengaruh selektif pada susunan saraf pusat yang menyebabkan perubahan khas pada aktivitas mental dan perilaku. Psikotropika yang mempunyai potensi mengakibatkan sindroma ketergantungan digolongkan menjadi empat golongan, yaitu:

- a. Psikotropika golongan I, yaitu psikotropika yang tidak digunakan untuk tujuan pengobatan dengan potensi ketergantungan yang sangat kuat. Contohnya antara lain: lisergid, ekstasi dan lain-lain
- b. Psikotropika golongan II, yaitu psikotropika yang berkhasiat terapi dapat menimbulkan ketergantungan. Contohnya antara lain: amfetamin sulfat, dexamfetamin, metamfetamin dan lain-lain.
- c. Psikotropika golongan III, yaitu psikotropika dengan efek ketergantungan sedang dari kelompok hipnotik sedatif. Contohnya antara lain: amobarbital, fenobarbital dan lain-lain.
- d. Psikotropika golongan IV, yaitu psikotropika dengan efek ketergantungan ringan. Contohnya antara lain: diazepam, etil amfetamin dan lain-lain.

C. DIAZEPAM

1. Monografi (11,12)

Diazepam memiliki struktur sebagai berikut :



Gambar 1. Struktur kimia Diazepam

Rumus molekul : $C_{16}H_{13}ClN_2O$

Nama kimia : 7-klor-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on

Bobot molekul : 284,74

Pemerian : Serbuk hablur, berwarna putih atau hampir putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau, mula-mula tidak mempunyai rasa, kemudian pahit

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air; mudah larut dalam kloroform; larut dalam etanol

2. Sifat farmakologi (13,14)

Diazepam merupakan obat golongan benzodiazepin yang berkhasiat sebagai sedatif dan terutama digunakan sebagai antiansietas. Sedativa berfungsi menurunkan aktivitas, mengurangi ketegangan dan keresahan, serta menenangkan penggunanya. Golongan benzodiazepin dapat menekan susunan saraf pusat dengan khasiat sedatif dan hipnotisnya. Jika penggunaannya terus menerus untuk jangka lama (lebih dari 2-4 minggu) dapat menimbulkan kebiasaan serta ketergantungan fisik dan psikis. Pada sebagian penderita (dengan kebiasaan penyalahgunaan obat), penggunaan benzodiazepin dapat menimbulkan ketergantungan obat. Oleh karena itu, di beberapa negara, semua senyawa benzodiazepin dimasukkan ke dalam Undang-Undang Narkotik (Opium Wet).

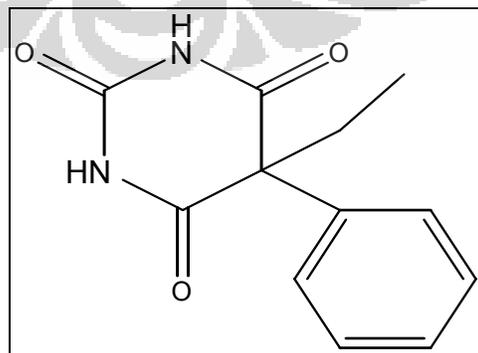
Disamping itu diazepam juga berdaya sebagai antikonvulsif. Berdasarkan khasiat ini, diazepam digunakan untuk epilepsi. Diazepam dapat menyebabkan tidur dan penurunan kesadaran yang disertai nistagmus dan bicara lambat, tetapi tidak berefek analgesik. Dosis diazepam 5-10 mg/kali untuk dewasa dan 0,2-0,3 mg/kgBB/hari untuk anak.

Efek samping yang lazim untuk diazepam yakni mengantuk, pusing dan kelemahan otot. Sedangkan efek samping berat dan berbahaya yang menyertai penggunaan diazepam yaitu dapat terjadi depresi napas sampai henti napas, hipotensi dan henti jantung.

D. FENOBARBITAL

1. Monografi (11)

Fenobarbital memiliki rumus struktur sebagai berikut :



Gambar 2. Struktur kimia Fenobarbital

Rumus molekul : $C_{12}H_{12}N_2O_3$

Nama kimia : asam 5-etil-5 fenilbarbiturat

Bobot molekul : 232,24

Pemerian : Hablur atau serbuk hablur, putih tidak berbau, rasa agak pahit

Kelarutan : Sangat sukar larut dalam air; agak sukar larut dalam kloroform; larut dalam etanol

2. Sifat farmakologi (13)

Fenobarbital merupakan obat golongan barbiturat yang berkhasiat sebagai hipnotik sedatif yang berefek utama depresi susunan saraf pusat. Hipnotika adalah zat-zat yang dalam dosis terapi diperuntukkan meningkatkan keinginan tidur dan mempermudah atau menyebabkan tidur. Lazimnya, obat ini diberikan pada malam hari. Bilamana zat-zat ini diberikan pada siang hari dalam dosis yang lebih rendah untuk tujuan menenangkan, maka dinamakan sedatif (obat-obat pereda). Hipnotika/sedativa termasuk dalam kelompok psikoleptika yang mencakup obat-obat yang menekan atau menghambat fungsi-fungsi susunan saraf pusat.

Dewasa ini hanya beberapa barbiturat yang masih digunakan untuk indikasi-indikasi tertentu seperti fenobarbital yang memiliki sifat antikonvulsif. Dosis fenobarbital 15-30 mg bekerja sebagai sedativum dan 100 mg atau lebih sebagai obat tidur. Overdosis barbiturat dapat

menimbulkan depresi sentral dengan penghambatan pernapasan berbahaya, koma dan kematian.

E. METODE ANALISIS PSIKOTROPIKA

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis psikotropika, yaitu antara lain:

1. Analisis secara simultan benzodiazepin menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom Supelcosil LC-18, fase gerak metanol-asetonitril-Kalium dihidrogen fosfat 0,005 M dan dapar ammonium asetat 0,1 M (pH 6,0 dengan asam asetat glasial) (26,5:16,5:57, v/v), kecepatan alir 2 ml/menit pada panjang gelombang 245 nm (6).
2. Analisis diazepam dalam minuman segar secara *High-Performance Thin-Layer Chromatography* (HPTLC) (7).
3. Analisis pemisahan psikotropika golongan sedatif secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan kolom C₁₈, 25 cm x 4,6 mm dengan fase gerak isokratik metanol-air (60:40, v/v), kecepatan alir 0,5 ml/menit pada panjang gelombang 220 nm (8).
4. Analisis stimulan dalam makanan tambahan secara Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (KC-SM) menggunakan fase gerak gradien campuran asetonitril, air dan asam asetat (eluen A: 3/97/0,2; eluen B: 95/5/0,2; v/v), kecepatan alir 0,2 ml/menit (9).

5. Analisis stimulan sebagai kontaminan dalam suplemen nutrisi padat secara Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (KC-SM) (15).
6. Analisis tujuh obat golongan benzodiazepin dalam suplemen makanan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan fase gerak 1-Heptansulfonat sebagai garam Na 5 mM dlm air/asetonitril 1000 ml (13:7, v/v), dengan penambahan asam fosfat sampai pH 2,4 (16).
7. Analisis kuantitatif diazepam dalam biskuit krim secara *High-Performance Thin-Layer Chromatography* (HPTLC) menggunakan fase gerak metanol-asetonitril-tetrahidrofur:air (15:55:4:26, v/v) (17).
8. Studi analisis amfetamin dan metamfetamin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan fase gerak isokratik asetonitril dan asam ortofosfat pH 2,1 (15:85, v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit (18).
9. Analisis pemisahan golongan barbital (barbital, luminal, prominal, revinal) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan kolom C₁₈, 15 cm x 4 mm, fase gerak isokratik air-asetonitril (45:55, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 230 nm (19).
10. Studi perbandingan metodologi *capillary electrophoresis* dan *Reversed Phase-Liquid Chromatography* untuk pemisahan diazepam dalam sediaan tablet menggunakan kolom Lichrosper® 100 RP-18, dengan fase gerak metanol-asetonitril-air (45:25:30, v/v), kecepatan alir 0,8 ml/menit pada panjang gelombang 242 nm (20).
11. Analisis benzodiazepin dosis rendah secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan ekstraksi fase padat menggunakan kolom SPE C₁₈

dengan fase gerak asetonitril-metanol-dikalium hidrogen fosfat 10 nmol/l pH 3,7 (30:2:100, v/v), kecepatan alir 1,5 ml/menit pada panjang gelombang 240 nm (21).

12. Pemisahan secara simultan etosuksimid dan fenobarbital pada jaringan otak, serum dan urin secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan kolom Spherisorb® C₁₈ dengan fase gerak asetonitril-metanol-dapar fosfat (21:24:25, v/v) (22).

13. Pemisahan fenobarbital secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan kolom C₁₈, fase gerak tetrametilammonium klorida 0,003 M dalam air-metanol (3:2, pH 7,4, v/v) pada panjang gelombang 240 nm (23).

14. Pemeriksaan asam asetilsalisilat, parasetamol, kofein dan fenobarbital dalam tablet secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan fase gerak campuran asetonitril-air (25:75, v/v) dengan penambahan asam fosfat sampai pH 2,5, kecepatan alir 2,0 ml/menit (24).

F. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (*High Performance Liquid Chromatography*)

1. TEORI

Kromatografi merupakan teknik yang mana solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati

suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam (25).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT atau biasa juga disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang, antara lain: farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri-industri makanan. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (25).

Keuntungan penggunaan KCKT antara lain: (26, 27)

- Waktu analisis cepat

Biasanya waktu analisis kurang dari satu jam, banyak analisis yang dapat dilakukan dalam 15-30 menit, untuk analisis yang tidak rumit dapat dicapai waktu analisis yang kurang dari 5 menit.

- Daya pisahnya baik

Kemampuan pelarut untuk berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak memberikan parameter tambahan untuk mencapai parameter yang dikehendaki.

- Peka

Kepekaannya sangat tergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.

- Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi

- Kolom dapat dipakai kembali
- Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil
- Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan

Sebagian besar detektor yang dipakai pada KCKT tidak merusak komponen yang dianalisis, sehingga zat yang telah dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor.

- Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

Hal ini sangat bergantung pada detektor yang digunakan. Namun detektor KCKT dapat mendeteksi zat sampai dengan kadar *ppt (part per trillion)*

2. KOMPONEN-KOMPONEN KCKT

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok, yaitu: wadah fase gerak, sistem penghantaran fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (25).

a. Wadah fase gerak pada KCKT (25)

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (inert). Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (pembuangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis. Pada saat membuat pelarut untuk fase gerak,

maka sangat dianjurkan untuk menggunakan pelarut, dapar, dan reagen dengan tingkat kemurnian yang sangat tinggi, dan lebih terpilih lagi jika pelarut-pelarut yang akan digunakan untuk KCKT berderajat KCKT (*HPLC grade*).

Adanya pengotor dalam reagen dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi. Adanya partikel yang kecil dapat terkumpul dalam kolom atau dalam tabung yang sempit, sehingga dapat mengakibatkan suatu kekosongan pada kolom atau tabung tersebut. Karenanya, fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel kecil ini.

b. Fase gerak pada KCKT

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel (25).

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan dapar dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol (25). Fase gerak yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut (26):

- a. Murni
 - b. Tidak bereaksi dengan kolom
 - c. Sesuai dengan detektor
 - d. Selektif terhadap komponen
 - e. Dapat melarutkan cuplikan
 - f. Mempunyai viskositas yang rendah
 - g. Memungkinkan memperoleh kembali cuplikan dengan mudah
 - h. Harganya wajar
 - i. Dapat memisahkan zat dengan baik
- c. Pompa pada KCKT (25)

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut, yakni: pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam.

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada dua jenis pompa dalam KCKT, yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan alir fase gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan.

d. Penyuntikan sampel pada KCKT

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik (injektor) yang terbuat dari tembaga tahan karat (28).

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Jenis injektor yang dapat digunakan antara lain: injektor alir henti, septum, katup jalan kitar dan autoinjektor (26).

e. Kolom pada KCKT

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Untuk menahan tekanan yang tinggi, kolom dibuat dari bahan yang kokoh seperti *stainless steel* atau campuran logam dengan gelas. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT, karena ikut menentukan keberhasilan analisis. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu (27):

1). Kolom analitik

Panjang kolom berkisar antara 10-30 cm, diameter dalam 4-10 mm, ukuran partikel umumnya 3,5 dan 10 μm .

2). Kolom preparatif

Kolom preparatif umumnya memiliki diameter dalam 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom sekitar 25-100 cm.

f. Fase diam pada KCKT (25)

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren

dan divinil benzen. Silika yang dimodifikasi mempunyai karakteristik kromatografik dan selektifitas yang berbeda jika dibandingkan dengan silika yang tidak dimodifikasi.

Oktadesil silika (ODS atau C_{18}) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi.

g. Detektor KCKT (25)

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu: detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa; dan golongan detektor yang spesifik yang hanya mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi dan elektrokimia.

Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut:

- a. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel
- b. Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil
- c. Stabil dalam pengoperasiannya
- d. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas
- e. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak

Jenis detektor yang umum digunakan pada KCKT antara lain:

1. Detektor Spektrofotometri UV-Vis

Detektor jenis ini merupakan detektor yang paling banyak digunakan dan sangat berguna untuk analisis di bidang farmasi karena kebanyakan senyawa obat mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar UV-Vis.

Detektor ini didasarkan pada adanya penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) pada kisaran panjang gelombang 190-800 nm oleh spesies solut yang mempunyai struktur atau gugus kromofor.

2. Detektor *photodiode-array* (PDA)

Detektor PDA merupakan detektor UV-Vis dengan berbagai keistimewaan. Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses. Selama proses berjalan, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan (biasanya antara 190-400) dapat ditampilkan.

3. Detektor Fluoresensi

Fluoresensi merupakan fenomena luminisensi yang terjadi ketika suatu senyawa menyerap sinar UV atau visibel lalu mengemisikannya pada panjang gelombang yang lebih besar. Tidak semua senyawa obat mempunyai sifat fluoresen sehingga detektor fluoresensi ini sangat spesifik.

4. Detektor indeks bias

Detektor indeks bias merupakan detektor yang bersifat universal yang mampu memberikan respon (signal) pada setiap zat terlarut. Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase gerak).

5. Detektor elektrokimia

Banyak senyawa organik (termasuk obat) dapat dioksidasi atau direduksi secara elektrokimia pada elektroda yang cocok. Arus yang dihasilkan pada proses ini dapat diperkuat hingga memberikan respon yang sesuai. Kepekaan detektor elektrokimia pada umumnya tinggi. Detektor elektrokimia yang paling banyak digunakan adalah detektor konduktivitas dan detektor amperometri.

h. Komputer, Integrator, atau Rekorder (25)

Alat pengumpul data seperti komputer, integrator, atau rekorder dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu mem-plotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis (pengguna).

3. ANALISIS (25)

Analisis KCKT dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif

a. Analisa kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan dengan memperhatikan waktu retensi. Komponen yang dipisahkan dapat diidentifikasi dari waktu retensinya yang dibandingkan dengan waktu retensi dari senyawa standar yang dipisahkan pada kondisi kromatografi yang sama. Parameter analisis ini hanya waktu retensi, pada kondisi kromatografi yang telah divalidasi (distandarkan) atau dengan metode *spiking*.

b. Analisis kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya.

4. PERHITUNGAN DALAM KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

a. Retensi relatif (α)

$$\alpha = \frac{t_2 - t_a}{t_1 - t_a}$$

t_1 = waktu retensi baku pembanding

t_2 = waktu retensi zat uji

t_a = waktu retensi komponen inert (fase gerak)

b. Jumlah lempeng teoritis

$$N = 16 \frac{t^2}{W^2}$$

t = waktu retensi zat

W = lebar alas puncak

c. HETP

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

L = panjang kolom

N = jumlah lempeng teoritis

d. Faktor kapasitas (k')

$$k' = \frac{t}{t_a} - 1$$

t = waktu retensi zat

t_a = waktu retensi fase gerak

e. Resolusi

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right)$$

N = jumlah lempeng teoritis

α = retensi relatif

k' = faktor kapasitas

f. Faktor ikutan

$$t_f = \frac{W_{0,05}}{f}$$

$W_{0,05}$ = lebar alas puncak pada 5% tinggi

f = jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak dihitung dengan ketinggian 5% puncak dari garis dasar

G. VALIDASI METODE ANALISIS (28)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin metode analisis yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal serta dapat dipercaya. Validasi metode analisis perlu dilakukan di industri, laboratorium pengawasan mutu dan untuk metode-metode yang diusulkan menjadi metode resmi. Validasi metode analisis perlu dilakukan karena:

1. Hampir semua aspek dalam masyarakat didukung oleh pengukuran analisis
2. Biaya analisis yang sangat tinggi, terlebih lagi biaya tambahan yang timbul akibat keputusan yang diambil berdasarkan hasil analisis tersebut
3. Hasil analisis yang tidak dapat dipercaya, tidak akan ada artinya dan sama halnya dengan tidak dilaksanakannya analisis tersebut.
4. *Customer* mengharapkan dapat mempercayai hasil analisis yang dilaporkan
5. Hasil analisis harus dapat menunjukkan kesesuaian dengan tujuan, yaitu:
 - a. Cukup handal, sehingga semua keputusan yang didasarkan atas data analisis dapat diambil dengan penuh keyakinan

- b. Ketidakpastian hendaknya dievaluasi sehingga secara internal nilainya konsisten dan hendaknya dicatat dengan cara yang mudah dimengerti
- c. Permasalahan sampling perlu mendapatkan perhatian

Suatu metode analisis perlu divalidasi jika:

1. Metode tersebut baru dikembangkan untuk suatu permasalahan khusus
2. Metode yang selama ini sudah rutin, direvisi untuk suatu pengembangan atau diperluas untuk memecahkan suatu permasalahan analisis yang baru
3. Hasil pengawasan mutu menunjukkan bahwa metode yang sudah rutin tersebut berubah dengan waktu
4. Metode rutin dilakukan di laboratorium yang berbeda, atau dilakukan oleh analis yang berbeda, atau dilakukan dengan peralatan yang berbeda

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis, antara lain:

1. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Syarat akurasi yang baik adalah uji perolehan kembali (UPK) bernilai 98-102%.

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analisis yang sama pada kondisi sama dan pada interval waktu yang pendek. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium.

3. Selektivitas (spesifisitas)

Selektivitas atau spesifitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat

penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya.

4. Linieritas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linieritas yang dapat diterima. Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan jika dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

a. Batas Deteksi

$$\text{LOD} = \frac{k \times S_b}{S_I} ; k = 3$$

b. Batas Kuantitasi

$$\text{LOQ} = \frac{k \times S_b}{S_I} ; k = 10$$

S_b = Simpangan baku respon analit dari blangko

S_I = arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

6. Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dan lain-lain. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau

lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara laboratorium dan antar analis. Ketangguhan metode ditentukan dengan menganalisis beningan suatu lot sampel yang homogen dalam laboratorium yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda, dan lingkungan yang berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama.

7. Kekuatan (*robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek pada presisi dan akurasi.