**II. TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1. Cabe**

 Cabe adalah tanaman asli benua Amerika yaitu Amerika selatan, ditemukan oleh Columbus. Tanaman cabe mudah ditanam didataran tinggi maupun rendah dengan budidaya tidak rumit, jenis cabe yang dikenal di Indonesia diantaranya cabe rawit, cabe merah, cabe keriting dan paprika. Diantara jenis cabe tersebut, cabe rawit berumur paling panjang dapat mencapai usia tahunan. Buah cabe rawit memiliki ukuran paling kecil dibandingkan jenis cabe lainnya, tetapi rasanya paling pedas. Di Indonesia ada dua jenis cabe rawit, yakni cabe besar (*Capsicum annuum var. Longum*) dan cabe kecil (*Capsicum frutescent Longum*). Cabang rawit termasuk golongan cabe kecil, yang mempunyai nama daerah yang berbeda. Di Yogyakarta dikenal sebagai Lombok riwit, di daerah Sunda dikenal cabe cengek leutik, di Gayo disebut pentek, di Madura dikenal sebagai taena manok, dan di Nias disebut lada mini. ( Haryoto, 2009).

Cabe rawit mengandung vitamin A = 11.050 SI, kadar vitamin A tersebut setara dengan kandungan vitamin A dalam daun singkong = 11.000 SI, hampir dua kali lipat dibandingkan dengan kadar vitamin A dalam bayam, dan sedikit lebih rendah dari wortel =12.000 SI. Cabe rawit juga mengandung bahan-bahan mineral yang cukup tinggi terutama zat besi dan calcium. Kedua jenis mineral tersebut sangat diperlukan bagi pertumbuhan manusia, digunakan sebagai salah satu bahan dalam pembuat sambal. Selain itu cabai rawit pun berkhasiat sebagai obat eksim, rematik, dan pelangsing tubuh. (Haryoto, 2009). Kandungan Gizi cabe rawit dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Gizi Cabai Rawit (dalam 100 gram buah segar)

|  |  |
| --- | --- |
| **Jenis Zat Gizi** | **Kadar** |
| Energi ProteinLemak KarbohidratKalsiumFosfor Zat Besi Vitamin A Vitamin B1Vitamin C Air  | 103 kal4,7 g2,4 g19,9 g45 mg85 mg2,5 mg 11.050 SI0,24 mg70 mg71,2  |

Sumber : Direktorat Gizi Depkes RI, 1979

**Klasifikasi cabai adalah :**

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas : Asteridae

Ordo : Solanales
Famili : [Solanaceae](http://www.plantamor.com/index.php?plantsearch=Solanaceae) (suku terung-terungan)
Genus : [Capsicum](http://www.plantamor.com/index.php?plantsearch=Capsicum)
Spesies : *Capsicum frutescens* L.

([www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com))

**2.2. Ekstraksi**

**Ekstraksi** adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan “invisible” (tidak saling bercampur), biasanya air dan yang lainnya [pelarut](http://id.wikipedia.org/wiki/Pelarut) [organik](http://id.wikipedia.org/w/index.php?title=Organik&action=edit&redlink=1), atau larutan padat dengan pelarut organic.

Seringkali campuran bahan padat dan cair (misalnya bahan alami) tidak dapat atau sukar sekali dipisahkan dengan metode pemisahan mekanis atau termis, karena komponennya saling bercampur secara sangat erat, peka terhadap panas, perbedaan sifat-sifat fisiknya terlalu kecil, atau tersedia dalam konsentrasi yang terlalu rendah.

(<http://www.chem-is-try.org/materi_kimia/kimia-industri/teknologi-proses/ekstraksi/>)

Jenis-jenis ekstraksi yang biasanya dilakukan dilaboratorium diantaranya :

1. Ekstraksi cara dingin, diantaranya :
* Maserasi, adalah ekstraksi menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu kamar. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan.
* Perkolasi, adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru sampai didapat hasil ekstraksi yang sempurna, dan pada umumnya dilakukan pada suhu ruang.
1. Ekstraksi cara panas, diantaranya :
* Reflux, adalah ekstraksi pelarut pada temperature didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relative konstan dengan adanya pendingin balik
* Sokletasi, adalah penarikan komponen kimia yang dilakukan dengan cara sampel yang dianalisa ditempatkan dalam klonsong (thimble) yang telah dilapisi kertas saring sedemikian rupa, cairan penyari dipanaskan dalam labu alas bulat sehingga menguap dan dikondensasikan oleh kondensor bola menjadi molekul-molekul cairan penyari yang jatuh ke dalam klonsong yang berisi sampel yang akan dianalisis, seluruh cairan akan turun kembali ke labu alas bulat melalui pipa kapiler bila cairan penyari telah mencapai permukaan sifon sehingga terjadi sirkulasi. Ekstraksi sempurna ditandai bila cairan di sifon tidak berwarna, tidak tampak noda jika dilakukan KLT, atau sirkulasi telah mencapai 20 – 25 kali. Ekstrak yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan.
* Rotavapor, adalah proses pemisahan ekstrak dari cairan penyarinya dengan pemanasan yang dipercepat oleh putaran dari labu alas bulat, cairan penyari dapat menguap 5 – 10oC di bawah titik didih pelarutnya, hal ini disebabkan oleh adanya penurunan tekanan. Dengan bantuan pompa vakum, uap larutan penyari akan menguap naik ke kondensor dan mengalami kondensasi menjadi molekul-molekul cairan pelarut murni yang ditampung dalam labu alas dasar bulat.
* **Digesti** merupakan maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) yang dilakukan pada suhu lebih tinggi dari suhu ruangan, secara umum dilakukan pada suhu 40ºC – 50ºC.
* **Infusa** merupakan proses ekstraksi dengan merebus sample (khusunya simplisia) pada suhu 900C

**2.3. Kapsaisin**

Kapsaisin sering disebut kapsaisinoid yaitu kelompok senyawa amida dari vanililamin dengan asam lemak berantai cabang, panjang rantai karbon 9 sampai 11 dan merupakan kelompok senyawa penyebab rasa pedas dari cabe. Kelompok senyawa ini hanya dijumpai pada buah marga Capsaicum dari suku Solanaceae, komponen utama yang dikandungnya adalah kapsaisin dan dihidrokapsaisin. Sedangkan homokapsaisin, homodihidrokapsaisin, nondihidrokapsaisin dapat terkandung didalam cabe sebagai komponen tambahan yang tidak selalu dikandung dalam buah marga capsaicum. Namun demikian tidak semua kultivar Capsicum mengandung kapsaisinoid sehingga ada buah cabe tertentu yang tidak pedas ( Sukrasno, dkk )

Di Indonesia dikenal dua jenis Capsicum yaitu *C. annuum* dengan berbagai nama pasarannya yaitu cabe merah, cabe paprika, cabe gendot, dan cabe keriting, sedangkan cabe rawit termasuk kelompok *Capsicum frutescens* . Variasi bentuk, ukuran dan warna buah C. annuum lebih banyak daripada yang dijumpai pada *C.frutescens.* Menurut penelitian beberapa kultivar *C. annuum* tidak pedas, sedangkan semua kultivar *C.frutescens* sangat pedas.

 Kapsaisin mempunyai nama kimia (E)-N-(4 hidroksi-3-metoksiphenilmetil)8-metil-6none amida; trans-8-metil-N-Vinil-6-noneamida; N(4 hidroksi-3-etoksi benzil)-8-metil none-trans-6-amida; dengan formula kimia C18H27NO3.

Sifat kimia dan fisika kapsaisin adalah sebagai berikut : a) Mudah larut dalam dietil eter, benzen, metanol, kloroform, air panas dan sedikit larut dalam CS2. b). Bentuk kristal segi empat monoklin dan c) Titik leleh dalam petroleum eter 65oC.

Rumus Bangun kapsaisin adalah seperti dibawah ini

|  |
| --- |
| **Kapsaisin** |
| Gambar |
|  |
| [Nama Sistematis](http://id.wikipedia.org/wiki/Tata_nama_IUPAC) | 8-Metil-N-vanilil-trans-6-nonenamida |
| Nama lain | (E)-N-(4-Hidroksi-3-metoksibenzil)-8-metilnon-6-enamida,trans-8-Metil-N-vanililnon-6-enamida, (E)-Kapsaisin, |
| [Rumus molekul](http://id.wikipedia.org/wiki/Rumus_kimia) | (CH3)2CHCH=CH(CH2)4CONHCH2C6H3-4-(OH)-3-(OCH3)C18H27NO3 |
| [Massa molar](http://id.wikipedia.org/wiki/Massa_molar) | 305,41 g/mol |
| [Titik leleh](http://id.wikipedia.org/wiki/Titik_leleh) | 62 - 65 °C |
| [Titik didih](http://id.wikipedia.org/wiki/Titik_didih) | 210 - 220 °C @ 0,01 Torr |
|  |

**Sumber : Dari Wikipedia bahasa Indonesia, ensiklopedia bebas**

Cabe berasa pedas apabila dimakan, hal ini disebabkan karena senyawa kapsaisin berikatan dengan reseptor nyeri dimulut dan kerongkongan sehingga menyebabkan rasa pedas, kemudian reseptor ini mengirimkan sinyal ke otak yang dan menyatakan bahwa sesuatu yang pedas telah dimakan. Otak merespon sinyal ini dengan menaikan denyut jantung, meningkatkan pengeluaran keringat, dan melepaskan hormon endofrin.(Setiadi, 1996).

# 2.4. Metanol

Metanol adalah senyawa alkohol alifatik, jernih, tidak berwarna dan berbau alkohol. Beracun terutama menyerang syaraf mata. Metanol juga dikenal sebagai metil alkohol atau spiritus adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH3OH, merupakan alkohol yang paling sederhana, wujud cairan yang ringan, mudah menguap, mudah terbakar dan beracun dengan bau yang khas. Digunakan sebagai bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan additif bagi etanol industri.

Rumus bangun dari methanol :

|  |  |
| --- | --- |
|  | Gambar  |
| [Rumus molekul](http://id.wikipedia.org/wiki/Rumus_kimia) | : CH3OH |
| Sifat-sifat dari methanol adalah : |
| [Massa molar](http://id.wikipedia.org/wiki/Massa_molar) | : 32.04 g/mol |
| Penampilan | : cairan tak berwarna |
|  |  |
| [Titik leleh](http://id.wikipedia.org/wiki/Titik_leleh) | : –97 °C, -142.9 °F (176 K) |
| [Titik didih](http://id.wikipedia.org/wiki/Titik_didih) | : 64.7 °C, 148.4 °F (337.8 K) |
| [Kelarutan](http://id.wikipedia.org/wiki/Kelarutan) dalam [air](http://id.wikipedia.org/wiki/Air) | : bercampur sempurna, tetapi methanol termasuk pelarut  Non polar |

Karena sifatnya yang beracun, metanol sering digunakan sebagai bahan additif pada pembuatan alkohol untuk penggunaan industri, penambahan "metanol" ini akan menghindarkan industri dari pajak yang dapat dikenakan karena etanol merupakan bahan utama untuk minuman keras.

**2.5. Florisil**

 Florisil sering digunakan sebagai adsorbent untuk kromatografi. Florisil merupakan sinonim dari activated magnesium silicate, mempunyai :

Rumus molekul : MgO3Si

Berat Molekul : 100,39

Rumus bangun :

 : 

**2.6. Validasi dan Verifikasi Metode Analisis**

 Meningkatnya persaingan bebas di segala bidang termasuk laboratorium dibutuhkan suatu laboratorium yang berkualitas yang dapat diterima oleh konsumen, hal ini tidak terlepas dari kecenderungan yang terjadi pada kebijakan dan program yang diterapkan oleh organisasi internasional

Pada tahun 1976 FDA (Food and Drug Administration) membuat usulan peraturan tentang GLP (Good Laboratory Practice). Penerapan GLP bertujuan untuk meyakinkan bahwa data hasil uji yang dilakukan laboratorium telah benar. Jadi GLP adalah suatu alat manajemen laboratorium yang memperlakukan bagaimana mengorganisasikan laboratorium pengujian dengan tujuan mencegah kesalahan serta meningkatkan dan menjaga mutu data hasil uji laboratorium (Hadi, 2005).

 Sebagai sistem akreditasi yang berlaku diseluruh dunia adalah ISO/Guide 25:1978 yang merupakan edisi pertama dan mulai diterapkan. Kemudian direvisi dengan ISO/IEC Guide 25: 1982, kemudian disempurnakan lagi dengan ISO/IEC Guide 25:1990. “General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories”.

Pada tahun 1999, ISO/IEC Guide 25:1990 berubah namanya menjadi ISO/IEC 17025: 1999, sejalan waktu pada tahun 2000 BSN melakukan revisi dan berubah menjadi SNI 19-17025: 1999. Dan pada tahun 2005, ISO/IEC 17025 : 1999 disempurnakan lagi dan berubah menjadi ISO/IEC 17025: 2005 yang didalamnya ada beberapa klausul telah diamandemen.

Pada ISO/IEC 17025: 2005 berisi elemen-elemen sistem manajemen mutu laboratorium yang terdiri dari 15 persyaratan manajemen dan 10 persyaratan teknis yang berisi salah satunya adalah validasi atau verifikasi metode. (Hadi, 2005).

Verifikasi dan validasi adalah kegiatan yang membuktikan bahwa suatu prosedur, proses, peralatan, bahan, aktifitas atau sistem menunjukkan fungsi yang sesuai dan konsisten yang mencapai hasil yang seragam sesuai dengan yang diharapkan serta memenuhi persyaratan spesifikasi dan kualitas. Re-validasi atau verifikasi adalah pengolahan proses validasi sebelumnya untuk menyakinkan bahwa perubahan dalam proses dan atau proses lingkungan, apakah disengaja atau tidak , tidak berpengaruh secara nyata terhadap hasil pengujian (Sulistiowati, 2004; Swartz and Krull, (1997).

 Verifikasi dan validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004)

Tujuan memvalidasi metode adalah untuk mengetahui sejauh mana penyimpangan yang tidak dapat dihindari dari suatu metode pada kondisi normal dimana seluruh elemen terkait telah dilaksanakan dengan baik dan benar. Selain itu tujuan validasi metode adalah :

* + meyakinkan bahwa suatu metode analitik mampu memberikan hasil-hasil terpercaya yang dapat disimpulkan;
	+ meningkatkan kepercayaan internasional dari suatu laboratorium;
	+ analis-analis lebih percaya diri dari hasil-hasil yang dicapai sesuai dengan kualitas yang diinginkan.

Verifikasi metode ialah tindakan validasi pada beberapa atribut metode saja. Laboratorium harus menentukan atribut metode yang dibutuhkan. Spesifikasi analisis dapat menjadi acuan untuk merancang proses verifikasi. Rancangan yang baik akan menghasilkan informasi yang dibutuhkan serta meminimalisir tenaga, waktu, serta biaya. Pemilihan parameter validasi atau verifikasi tergantung pada beberapa faktor seperti aplikasi, sampel uji, tujuan metode, dan peraturan lokal atau internasional

**2.7. Parameter Verifikasi Metode**

Parameter verifikasi metode analisis menurut Harmita (2004) meliputi sebagai berikut :

* + 1. Akurasi (Kecermatan)

Akurasi adalah kedekatan masing-masing hasil pengujian dengan nilai sebenarnya, Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analis sangat ter­gantung kepada sebaran galat siste­matik di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk men­capai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengu­rangi galat sistematik tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur.

Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, se­jumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM (Certificate Reference Material) atau Standard Reference Material (SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditam­bahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah ter­tentu analit yang diperiksa ditam­bahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, per­sen peroleh kembali dinyatakan seba­gai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. % Perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel pla­sebo (eksepien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena ana­litnya berupa suatu senyawa endo­gen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat di­pakai metode adisi.

Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan (Harnita, 2004)

* + 1. Presisi atau keseksamaan

Presisi atau 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 analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah leng­kap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksama­an pada kondisi yang normal. Keter­tiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan pera­latan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula. Analis dilakukan terhadap sampel-sampel yang di­duga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama.

Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan pera­latan, pereaksi, dan analis yang ber­beda. 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. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit.

* + 1. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan (dalam rentang penggunaan) untuk menyebabkan hasil uji yang secara langsung atau melalui transformasi matematis yang umum dikenal proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dalam rentang penggunaan metode analisis.

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi (koefisien korelasi) yang dihitung berda­sarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai kon­sentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil an­tara hasil analisis terhadap konsen­trasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan pro­porsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transfor­masi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya.

* + 1. Keterulangan (repeatability)

Keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keter­ulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah leng­kap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksama­an pada kondisi yang normal. Keter­tiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan pera­latan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula. Analis dilakukan terhadap sampel-sampel yang di­duga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan pera­latan, pereaksi, dan analis yang ber­beda. 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. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Ditemukan bahwa koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara labo­ratorium adalah sekitar 2,5% ada pada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16%, dan pada kadar part per bilion (ppb) adalah 32%. Pada me­tode yang sangat kritis, secara umum diterima bahwa RSD harus lebih dari 2%. (Harmita, 2009)

Parameter analitik yang diper­lukan untuk validasi dapat bervariasi bergantung pada tipe prosedur ana­litik. Kategori umum penetapan yang memerlukan data validasi disajikan pada tabel 3 yang secara umum mencakup :

* Kategori I : metode analitikal un­tuk kuantitasi komponen maupun substansi bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) pada hasil akhir farmasetika ter­masuk dalam kategori I.
* Kategori II : Metode analitik untuk menentukan campuran dalam substansi bahan baku atau kompo­nen sisa pada produk akhir farma­setika dimasukkan dalam kategori II. Metode ini termasuk perhi­tungan kembali secara kuantitatif dan batas tes.
* Kategori III : Metode analitik ini untuk menentukan performa ka­rakteristik (contoh: disolusi, pe­lepasan obat) termasuk dalam kategori III.

**Tabel 2.** Parameter analitik yang harus dipertimbangkan untuk tipe prosedur analitik yang berbeda

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Parameter Performa Analitik | Kualitatif (ID) | Perhitungan kembali Kategori I | Perhitungan kembali Kategori II | Perhitungan Kembali Kategori III |
| Kuantitatif | Batas tes |
| Akurasi | Tidak | Ya | Ya | \* | \* |
| Presisi | Tidak | Ya | Ya | Tidak | ya |
| Spesifisitas | Ya | Ya | Ya | Ya | \* |
| Batas deteksi | Ya | Tidak | Tidak | Ya | \* |
| Batas kuantitasi | Tidak | Tidak | Ya | Tidak | \* |
| Linearitas | Tidak | Ya | Ya | Tidak | \* |
| Rentang | Tidak | Ya | Ya | \* | \* |
| Ketangguhan | Ya | Ya | Ya | Ya | ya |

Sumber : Harmita, 2004

Keterangan : (\*) : mungkin diperlukan tergantung sifat pengujian

* + 1. Uji Batas Deteksi dan batas kuantitas

Batas deteksi adalah jumlah ter­kecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi me­rupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit da­lam sampel yang masih dapat meme­nuhi kriteria cermat dan seksama.(Harmita, 2004).

Uji batas deteksi dan batas kuantitas merupakan pengujian sensitifitas alat yang digunakan dalam melakukan validasi metode. Uji sensitifitas adalah ratio antara perubahan respon alat ukur terhadap perubahan konsentrasi analit yang diukur. Sensitifitas (kepekaan) suatu teknik ditentukan dari kemiringan (slope) gradik kalibrasi.(Sumardi, 2006).

Dengan kata lain validasi atau verifikasi metode merupakan proses mendapatkan informasi penting untuk menilai kemampuan sekaligus keterbatasan suatu metode untuk : a) memperoleh hasil yang dapat dipercaya; b) menentukan kondisi dimana hasil data pengujian atau kalibrasi diperoleh; c) menentukan batasan suatu metode, misalnya akurasi, presisi, limit deteksi, pengaruh matrik, dan lain-lain.(Anwar Hadi, 2007).

**2.8. Metode Spektrofotometer UV-Vis**

 Analisa secara spektrofotometri berdasarkan pada kemampuan suatu senyawa dalam mengabsorpsi radiasi elektromagnetik dengan intensitas yang cukup. Kelebihan metode ini dibandingkan dengan metode konvensional adalah dapat meningkatkan daya deteksi, relatif lebih tepat, sederhana dan spesifik.

 Spektrofotometer UV-Vis bekerja pada daerah panjang gelombang (200 – 800) nm, digunakan dalam analisis suatu senyawa mengenai aspek kualitatif maupun kuantitatif. Metode ini bekerja berdasarkan adanya interaksi radiasi elektromagnetik dengan gugus kromofor yang dapat menimbulkan perubahan energi elektronik berupa spektrum kontinyu. Energi panjang gelombang yang diserap (diabsorpsi) yang digunakan pada pengukuran adalah panjang gelombang maksimum yang mempunyai kepekaan tinggi untuk mengetahui kuantitas analit, konfirmasi hasil analisis secara kuantitatif menggunakan hukum Lambert-Beer :

Hukum Lambert mempelajari Io dan It serta panjang media yang dilalui oleh cahaya. Bunyi hukum Lambert adalah “Bila suatu cahaya monokromatik dialirkan melalui suat media, maka tambah-turunnya intensitas cahaya (-dl) berbanding lurus dengan panjang media (dx)” atau dengan kata lain bahwa intensitas cahaya akan menurun bila panjang media yang dilalui cahaya bertambah.

 - dl/dx = kl

 - dl/I = k dx

Pengintegralan persamaan diatas adalah :

-∫ dll = ∫ k dx

-log e I = kx + C .....................(a)

C adalah tetapan integral yang dapat dihitung dengan memisalkan x = 0, sehingga I = Io, sehingga didapat :

 C = -log e lo

Harga C ini disispkan pada persamaan (a)

 -log It = kx – log e Lo

 It = Io e-kx ..................... (I)

Dimana :

It = Intensitas cahaya yang dipancakan setelah melalui media

k = tetapan

Io = cahaya masuk

Hukum Beer

 Bila suatu cahaya monokromatik dialirkan melalui suatu media, maka kecepatan turunnya intensitas cahaya berbanding lurus dengan kepekatan media (dc).

 -dl/dc ∞ I

Artinya, intensitas cahaya menurun apabila kepekatan media bertambah besar

 -dl/dc ∞ k dc

Hasil pengintegralannya adalah :

 It = Io-kc ................................(2)

Persamaan (1) dan (2) dapat diabungkan menjadi persamaan Beer-Lambert

 Log (I0/I) = ɛ. c.x = A ............................(3

Dimana :

Io = cahaya

It = cahaya yang dipancarkan

C = konsentrasi larutan (M)

x = panjang media

ɛ = koefisien molar, untuk konsentrasi dalam molar

A = Serapan/ Absorbans (a)

(RA. Day, Jr, Underwood A.L, 1980)

Lambert dan Beer membuat formulasi secara matematik hubungan antara transmitans atau absorbansi terhadap intensitas radiasi atau konsentrasi zat yang dianalisis dan tebal larutan yang mengabsorbsi. Dari persamaan (3) dapat dilihat bahwa absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi (Soendoro, 2004).

 Absorptivitas jenis/serapan jenis adalah serapan (A) dibagi dengan hasil perkalian kadar (C) yang dinyatakan dalam gram per 100 mL (% b/v) dan tebal lapisan zat yang menyerap sinar (b) dinyatakan dalam cm. Untuk tiap zat akan mempunyai nilai absorpsivitas jenis yang berbeda-beda

 Ketepatan dalam pengukuran absorpsi dengan spektrofotometri UV-Vis sangat mempengaruhi oleh beberapa hal, antara lain adalah kelarutan sampel dalam pelarut yang sesuai dan ada atau tidaknya gelembung. Kelarutan yang tidak sempurna dan adanya gelembung akan menjadi penghambat jalannya sinar sehingga pengukuran yang berlangsung tidak dapat memberikan hasil yang tepat.

 Instrumen spektrofotometer UV-Vis dibedakan menjadi 2 (dua) instrumen yaitu single beam dan double beam dapat dijabarkan dengan gambar sebagai berikut :

Sumber celah Filter kuvet fotosel detektor

Cahaya cahaya

 Gambar 1 : Skema spektrofotometer single beam

Sumber celah filter pembagi kuvet ukur & detektor

Cahaya cahaya cahaya kuvet pembanding

 Gambar 2. Skema spektrofotometer double beam

 Perbedaan cara kerja antara spektrofotometer single beam dan double beam adalah pada metode pengukuran absorban, yaitu pada single beam pengukuran dilakukan melalui dua tahap, yaitu kalibrasi alat yang bertujuan untuk menghilangkan interferensi pelarut dengan menggunakan blanko. Langkah kedua adalah pengukuran sampel. Untuk spektrofotometer double beam hanya dengan satu langkah karena blanko dan sampel diukur secara bersamaan. Unsur-unsur terpenting suatu spektrofotometer seperti yang ditunjukkan secara sistematik dalam gambar 3.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sumber |  | Monokromator |  | Sel Kuvet |  | Detektor |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  | Amplifier |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  | Recorder |

Gambar 3. Unsur-unsur terpenting alat spektrofotometer

 Setiap bagian peralatan optik dari spektrofotometer UV-Vis mempunyai fungsi dan peranan tersendiri yang saling terkait. Setiap fungsi dan peranan tiap bagian dituntut ketelitian dan ketepatan yang optimal, sehingga akan diperoleh hasil pengukuran yang tinggi tingkat ketelitian dan ketepatannya.

1. Sumber Radiasi

 Sumber energi radiasi yang kontinyu memancarkan spektrum, bergantung spektrum yang diperlukan maka sumber radiasi dapat digunakan berbagai macam sumber radiasi

1. Monokromator

 Monokromator adalah alat untuk mengisolasi dan memilih berkas sinar sempit dari panjang gelombang=panjang gelombang spektrum luas yang dipancarkan oleh sumber. Monokromator fungsinya adalah merubah sinar polikromatis menjadi monokromatis

1. Sel Kuvet

 Sel kuvet adalah wadah untuk sampel yang dianalisis. Ditinjau dari pemakaiannya kuvet ada dua macam, yaitu :

* + Kuvet permanen, yang terbuat dari bahan gelas atau leburan silica
	+ Kuvet disposible, untuk satu kali pemakaian yang terbuat dari teflon atau plastik

Ditinjau dari bahan yang dipakai untuk membuat kuvet dibedakan :

* + Kuvet dari leburan silika, dipakai pada daerah pengukuran panjang gelombang 190 nm – 1100 nm
	+ Kuvet dari bahan gelas, dipakai pada daerah pengukuran panjang gelombang 380 nm – 1100 nm.
1. Detektor

 Detektor adalah transuder yang mengubah energi radiasi menjadi isarat listrik yang besarnya setara dengan intensitas cahaya yang sampai pada detektor tersebut

1. Amplifier

 Amplifier dan rangkaian-rangkaiannya adalah penguat yang membuat isarat listrik cocok untuk diamati. Amplifier berfungsi sebagai penguat sinyal yang berasal dari detektor menjadi suatu potensial yang cukup besar untuk dapat direkam.