

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Gadung

Gadung (*Dioscore hispida* Dennst) merupakan salah satu jenis tanaman umbi-umbian yang memiliki potensi cukup besar sebagai bahan pangan alternatif. Tanaman ini belum banyak dimanfaatkan sebagai sumber pangan oleh masyarakat. Gadung berpotensi untuk dikembangkan karena kandungan karbohidrat yang cukup banyak. Pati mendominasi sebagian besar karbohidrat dalam umbi gadung. Kandungan karbohidrat pada umbi gadung sekitar 29,7 gram per 100 gram umbi gadung segar.

Berdasarkan asalnya, tumbuhan gadung pertama kali ditemukan di India bagian barat dan Cina bagian selatan, kemudian menyebar ke seluruh daerah tropis di Asia Tenggara, meliputi Indonesia, Malaysia, Karibia, Afrika Barat, dan Amerika Selatan (Utama and Rukismono, 2018). Di Indonesia, tanaman gadung kebanyakan ditemui tumbuh secara liar di hutan maupun tegalan. Budidaya yang belum banyak ditemui pada tanaman gadung, menjadikan belum ditemukannya data konkrit terhadap jumlah produksi gadung. Tanaman ini dapat hidup pada daerah dataran rendah hingga ketinggian 850 m di atas permukaan lain, selain itu tanaman ini dapat hidup pada daerah ketinggian yang mencapai 1200 m di atas permukaan (Sari dkk., 2013).

Tanaman gadung disusun oleh daun, batang, bunga, umbi dan buah. Tanaman ini dapat menjalar pada tanaman lain ataupun tumbuh menjalar di atas permukaan tanah. Umbi gadung memiliki bentuk dan ukuran yang beragam kebanyakan mempunyai bentuk bulat dengan ukuran yang beragam, dari berukuran kecil hingga besar. Kulit pada umbi gadung ditumbuhi oleh bulu-bulu akar yang relatif kaku, dengan warna gading hingga cokelat muda, pada umumnya warna pada umbi gadung berwarna putih gading ataupun kuning, umbi gadung sering ditemukan pada permukaan tanah. Gadung memiliki akar serabut, untuk memperbanyak dapat dilakukan dengan melakukan stek pada batang (Rukmana, 2001).

Klasifikasi umbi gadung menurut (Plantamor, 2022) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsoda
Subkelas	: Liliidae
Ordo	: Lilialess
Famili	: Dioscoreaceae

Genus : Dioscorea

Spesies : *Dioscorea hispida* Dennst

Berikut gambar tanaman gadung yang dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 2.1. Umbi gadung

(Dokumentasi Pribadi)

Gadung mengandung zat beracun yaitu HCN atau asam sianida dengan kadar yang cukup tinggi, umumnya kadar sianida dalam umbi gadung segar mencapai 469 mg/kg. Dengan metode pengolahan yang benar, kandungan sianida bisa diturunkan hingga tingkat yang aman apabila dimakan (Hariana, 2004). Jika dilihat dari kandungan kimia pada umbi gadung, kandungan air 78%, karbohidrat 18%, abu 0,69%, serat kasar 0,93%, diosgenin 0,2-0,7%, dan dioskorin 0,44%. Dengan memperhatikan kandungan karbohidrat yang cukup tinggi pada umbi gadung berpotensi menjadi sumber karbohidrat selain beras. Namun pemanfaatan gadung hingga saat ini masih terbatas pada pengolahan-pengolahan secara tradisional (Harijono dkk., 2008).

Tabel II.1. Komposisi Kimia Umbi Gadung (Per 100 gram)

No	Komposisi	Jumlah
1	Air	74,4 g
2	Energi	100 kal
3	Protein	0,9 g
4	Lemak	0,3 g
5	Serat	2,1 g
6	kalsium	79 mg
7	Fosfor	66 mg
8	Fe	0,9 mg
9	Vit C	2 mg

(Kementerian Kesehatan RI, 2018)

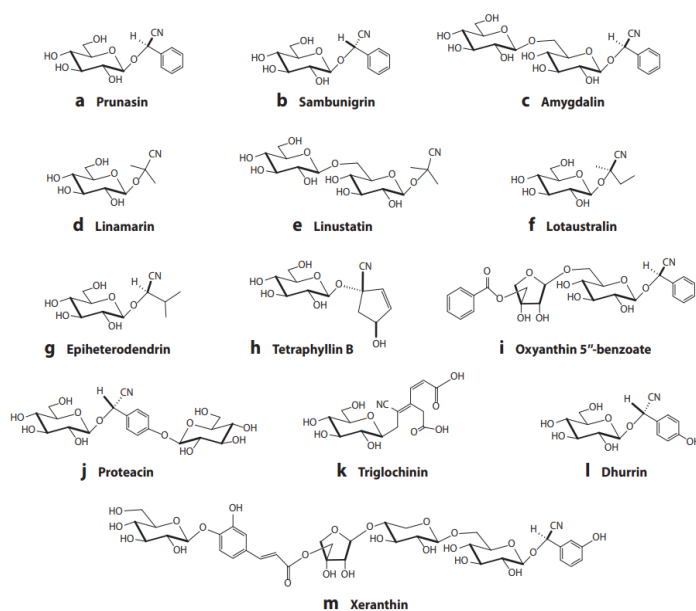
Umbi gadung dapat diolah menjadi produk makanan setengah jadi seperti tepung atau menjadi makanan pengganti nasi seperti dibuat menjadi keripik gadung. Kandungan senyawa seperti polisakarida larut air, diskorin dan dioskorin pada umbi gadung memiliki bagian terhadap pengobatan. Gadung mengandung lemak yang rendah yang bermanfaat untuk penderita obesitas, kandungan kalsium dalam umbi gadung cukup tinggi dibandingkan dengan beras dapat bermanfaat dalam pencegahan penyakit osteoporosis. Kekurangan karbohidrat berakibat pada kerusakan jaringan, kekurangan glukosa pada kadar gula darah memberikan gambaran terhadap kandungan karbohidrat pada makanan terhadap kadar gula darah. Respon indeks glikemiks terhadap keberadaan karbohidrat dan makanan yang memiliki karbohidrat yang tinggi contohnya buah-buahan, sayuran dan nasi dinyatakan sebagai indeks. Indeks glikemik yang tinggi menandakan karbohidrat dicerna secara cepat dan diserap dengan jumlah yang banyak sehingga menyebabkan gula dalam darah naik (I. P. Sari et al., 2013). Umbi gadung memiliki karbohidrat yang cukup tinggi dan polisakarida larut air yang baik untuk kesehatan sebagai penurun glukosa darah. Selain digunakan untuk bahan pangan, umbi gadung bisa dimanfaatkan untuk keperluan lainnya. Kandungan racun dioskorin pada umbi gadung mentah dapat dimanfaatkan untuk racun pada serangga maupun obat (T. A. Sari, 2008)

II.2. Sianida

Sianida ialah salah satu senyawa kimia atom karbon yang berikatan terhadap satu atom nitrogen yang dihubungkan oleh 3 ikatan molekul ($C\equiv N$) dan sianida merupakan senyawa yang mengandung gugus sianida (biasanya ditampilkan sebagai CN). Hidrogen sianida (HCN) merupakan salah satu contoh turunan sianida, dimana senyawa berbentuk gas. Hidrogen sianida memiliki nama lain seperti *formonitrile*, *hydrocyanic acid*, *prussic acid*, dan *cyclone*. Hidrogen sianida terdiri dari satu atom hidrogen yang berikatan dengan gugus sianida (CN) yang dihubungkan dengan ikatan molekul membentuk ($H-C\equiv N$) (Taylor dkk., 2006). Dari segi fisik, HCN adalah senyawa yang mudah menguap yang tidak memiliki warna disertai bau yang menyengat sebagaimana asam lainnya dan rasa yang pahit. Titik didih HCN adalah $25,7^{\circ}C$ (Pambayun, 2007). Kelarutan dalam keadaan bebas mudah larut dalam air. Senyawa ini terakumulasi dalam jaringan, namun ketika berada di permukaan, senyawa ini mudah menguap. Karena kelarutan dengan air yang baik, maka senyawa ini mudah dihilangkan dari bahan dengan cara pencucian dengan air (Winarno, 2004). Sianida merupakan suatu senyawa yang sering ditemukan pada banyak tumbuhan meskipun dalam konsentrasi kecil, terutama dalam bentuk glukosida sianogenik. Kandungan sianida relatif lebih tinggi ditemukan dalam rumput, kacang-kacangan, umbi-umbian dan pada biji tertentu (Nio, 1989). Asam sianida dilepaskan ketika tanaman rusak. Langkah pertama dalam proses penguraian adalah pelepasan molekul

glukosa dengan bantuan enzim glucosidase sebagai katalis. Sianohidrin yang terbentuk bisa berdisosiasi secara non-enzimatis dalam melepas asam sianida dan aldehid maupun keton, namun pada tanaman proses ini dilakukan dengan enzim sebagai pengkatalis (Widodo, 2005).

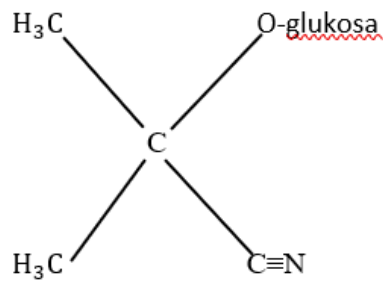
Glikosida sianogenik adalah senyawa hidrokarbon yang berikatan terhadap gugus CN dan gula yang diurai karena aktivitas hidrolisis glikosida sianogenik menjadi hidrogen sianida (HCN) yang bersifat toksik (beracun), maka dari itu proses hidrolisis gulosida sianogenik menghasilkan hidrogen sianida. Glikosida sianogenik berasal dari asam amino aromatik dan alifatik (tirosin, fenilalanin, valine, leusin, dan isoleusin) dan beberapa asam amino non-proteinogenik. Seperti dhuririn, prunasin, linamarin, dan lotaustralin merupakan monoglukosida yang paling umum pada glukosida sianogenik. Fenilalanin memiliki epimer yaitu prunasin dan sambunigrin. Turunan dari prunasi adalah diglikosida amygdalin. Valin memiliki turunan meliputi linamarin dan linustatin yang merupakan monoglukosida dan diglukosida. Lotaustralin bersumber pada isoleusin dan linamarin. Epiheterodendrin bersumber pada leusin. Benxoate merupakan contoh glikosida sianogenik yang lebih rumit yang bersumber pada fenilalanin dan terkandung glukosa dan residu apiosa. Glukosa, xilosa, dan apiosa merupakan residu gula yang memiliki peran terhadap pembentukan glikosida sianogenik (Gleadow & Møller, 2014). Berikut merupakan beberapa struktur turunan dari glukosida sianogenik dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 2.2. Struktur turunan glukosida sianogenik (Gleadow & Møller, 2014)

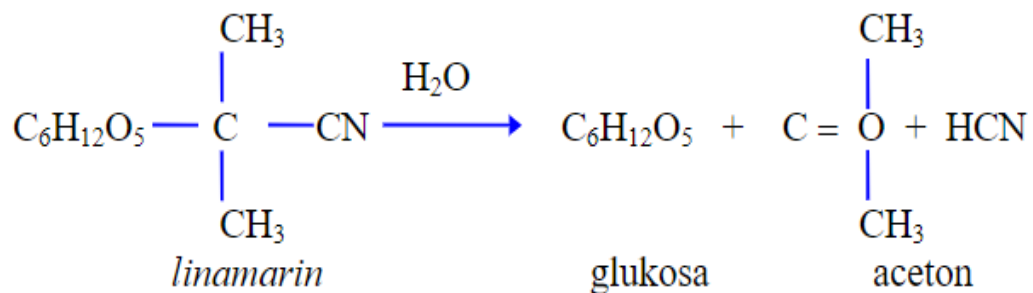
Salah satu contoh senyawa turunan dari glukosida sianogenik adalah linamarin. Senyawa ini merupakan hasil metabolisme dari suatu tanaman yang menimbulkan salah satu hasil degradasi

dari asam amino L-valin adalah linamarin. Struktur kimia dari linamarin ditunjukkan pada gambar berikut ini:



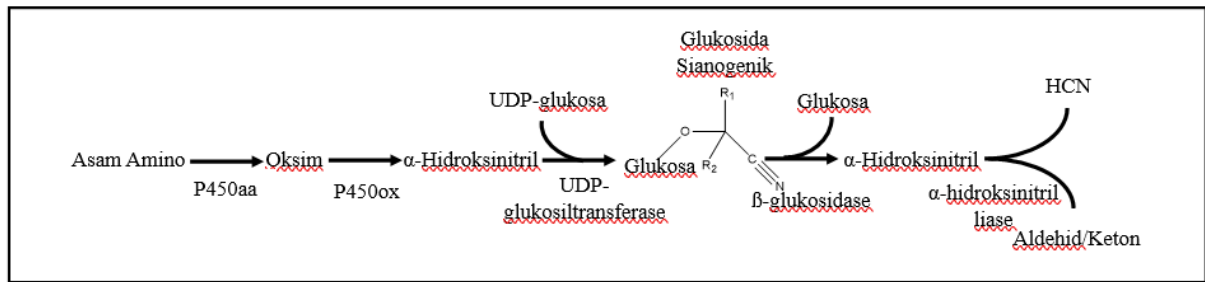
Gambar 2.3. Struktur linamarin
(Widodo, 2005)

Linamarin lebih banyak terkandung didalam umbi jika dibandingkan dengan bagian batang. Linamarin mudah larut didalam air dan akan hancur pada suhu 150°C. Apabila senyawa tersebut terhidrolisis oleh asam maupun enzim dapat membentuk aseton, glukosa, dan asam sianida. Berikut ini gambar proses hidrolisis linamarin:



Gambar 2.4. Proses hidrolisis linamarin
(Widodo, 2005)

Glikosida sianogenik berasal dari asam amino yang disintesis dan dikatalis dengan sitokrom P450s dan P450ox yang terikat dengan UDP-glukosiltransferase dengan oksim dan sianohidrin yang menjadi zat perantara membentuk glukosida sianogenik. Glukosida sianogenik mengalami proses sianogenesis pada saat β -glukosidik dihidrolisis dengan β -glikosidase spesifik untuk menjadikan α -hidroksinitril bahwa tidak stabil dan terurai menjadi asam sianida (HCN) dan keton, proses penguraian terjadi secara langsung maupun dalam keadaan pH tinggi (Gleadow and Møller, 2014). Berikut merupakan proses biosintesis dan bioaktivasi glukosida sianogenik menjadi asam sianida (HCN) ditunjukkan pada gambar berikut ini:



Gambar 2.5. Proses biosintesis atau bioaktivasi glukosida sianogenik (Gleadow & Møller, 2014)

Sianida merupakan suatu senyawa beracun yang bisa mengakibatkan dampak yang berbahaya. Jantung dan otak merupakan dua organ yang memerlukan oksigen dan berbahaya apabila terpapar oleh sianida, dimana apabila terpapar oleh sianida dapat menyebabkan kekurangan atau terhambatnya suplai oksigen, manusia yang mengonsumsi baik sengaja atau tidak sengaja terpapar sianida dapat mengalami keracunan (Tsani dkk., 2018)

Pernapasan sel dapat dihambat oleh asam sianida dengan mekanisme penghambatan pada reaksi bolak-balik terhadap enzim yang di dalam selnya mengandung Fe^{3+} . Enzim sitokrom oksidase merupakan enzim yang memiliki tingkat kepekaan yang tinggi terhadap inhibisi sianida, dan juga berperan dalam proses oksidasi dalam tubuh. Apabila terjadi ikatan yang kompleks terhadap enzim sianida, membuat rangkaian oksidasi akan terhalangi dan membuat oksigen didalam sel berkurang. Ketika asam sianida mengalami reaksi terhadap hemoglobin akan terbentuk cyano-Hb sehingga membuat darah tidak bisa mengangkut oksigen. Jika sel darah eritrosit dikelilingi oleh sianida, hal ini diidentifikasi sebagai methemoglobin. Dari kedua hal tersebut dapat mengakibatkan histotoxic-anoxia ditandai dengan gejala pernafasan cepat dan dalam. Apabila dalam tubuh terdapat sianida dapat mengakibatkan efek negatif yang sulit diatasi. HCN tiosianat akan diserap ulang pada saat masuk kedalam tubuh dan tidak dapat terbuang bersama urin walaupun HCN melalui glomerulus secara baik yang dapat menimbulkan gejala kronis sama halnya seperti klorida. Meskipun sistem peroksidase kelenjar tiroid dapat merubah tiosianat menjadi sulfat dan sianida, tetapi hal ini tetap membuat sel-sel memenuhi pada konsentrasi sianida diatas nilai ambang batas. Oleh karena itu, sianida dapat merugikan terhadap utilisasi protein umumnya pada asam-asam amino yang terdapat sulfur seperti metionin, sistein, vitamin B12, sistin, mineral besi, yodium, tembaga dan produksi tiroksin (Widodo, 2005).

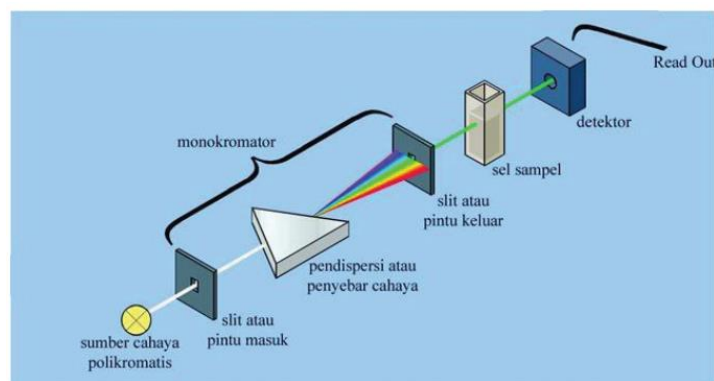
II.3. Spektrofotometri UV-Sinar Tampak

Spektrofotometri adalah metode analisis instrumental yang menggunakan dasar interaksi energi dengan materi. Spektrofotometri bisa digunakan dalam penentuan konsentrasi menggunakan

panjang gelombang tertentu terhadap larutan dengan melihat intensitas serapan. Absorbansi maksimum dihasilkan pada panjang gelombang maksimum yang digunakan. Prinsip kerja spektrofotometri yaitu berada pada daerah ultra violet maupun sinar tampak terjadi penyerapan secara spesifik terhadap senyawa kimia tertentu (Suhartati, 2017).

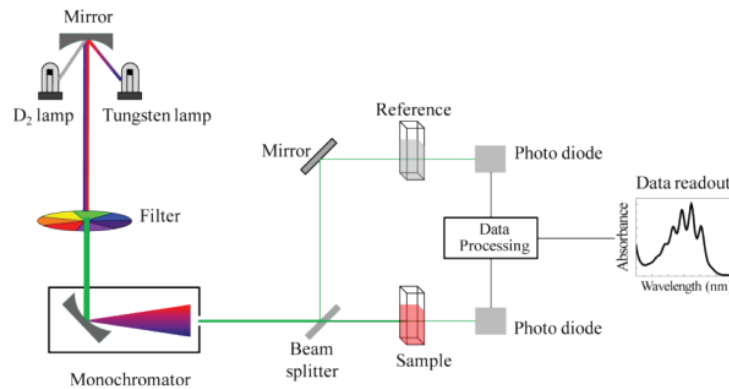
Kromofor, aoksokrom, efek batokromik atau pergeseran merah, efek hipokromik atau pergeseran biru, hipsokromik, dan hipokromik merupakan istilah-istilah yang sering digunakan pada spektrofotometri UV-Vis. Kromofor merupakan molekul yang secara kuat menyerap sinar pada daerah UV-Vis sebagai contoh seperti heksana, aseton, asetilen, benzena, karbonil, karbondioksida, karbonmonooksida, gas nitrogen. Gugus fungsi yang memiliki pasangan elektron bebas yang berikatan kovalen tunggal pada kromofor yang membuat intensif penyerapan sinar UV-Vis terhadap kromofor disebut sebagai ausokrom, sebagai contohnya seperti gugus hidroksi, amina, halida dan alkoksi (Suhartati, 2017).

Secara umum spektrofotometer terbagi menjadi dua tipe yaitu *single-beam* dan *double-beam*. Tipe *single-beam* dapat digunakan dalam pengujian secara kualitatif dengan melakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Keuntungan dari tipe ini yaitu harga yang relatif murah dan metode yang cukup sederhana. Beberapa tipe ini dapat digunakan untuk pengukuran pada daerah ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang terendah berkisar pada 190-210 nm dan tertinggi pada kisaran 800-1000 nm (Suhartati, 2017). Berikut ini merupakan diagram alat spektrofotometer UV-Vis *Single-beam*:



Gambar 2.6. Diagram alat spektrofotometer uv-vis single-beam (Suhartati, 2017)

Instrumen *double-beam* memiliki panjang gelombang berkisar pada 190-750 nm. Dimana untuk instrumen ini memiliki dua sinar yang terbentuk oleh potongan cermin yang membentuk pola V yang disebut sebagai pemecah sinar. Dimana pada tipe ini sinar pertama akan melalui blanko sedangkan untuk sinar kedua akan melalui sampel secara bersamaan. Diagram spektrofotometer UV-Vis *double-beam* dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 2.7. Diagram alat spektrofotometer uv-vis double-beam (Suhartati, 2017)

Sinar polikromatis pada sinar UV bersumber pada lampu deuterium sedangkan sinar tampak atau sinar visible bersumber pada lampu wolfram. Monokromator pada spektrofotometri uv-vis menggunakan lensa prisma dan filter optik. Kuvet merupakan tempat untuk sampel yang biasanya terbuat dari gelas atau kuarsa. Detektor foto atau detektor iodida foto berfungsi untuk menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan diubah menjadi arus (Suhartati, 2017).

Daerah pengukuran ultraviolet dan sinar tampak yang memiliki kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam panjang gelombang 200-800 nm dapat disesuaikan pada sistem optik yang digunakan. Instrumen UV-Vis terdiri dari beberapa komponen diantaranya sumber-sumber sinar, monokromator dan sistem optik.

1. Sumber-sumber Lampu

Sumber lampu yang digunakan pada daerah ultra violet menggunakan lampu deuterium yang memiliki panjang gelombang berkisar pada 190-350 nm sedangkan pada daerah sinar tampak sumber lampu yang digunakan yaitu lampu halogen kuarsa dengan panjang gelombang yang berkisar pada 350-900 nm.

2. Monokromator

Monokromator digunakan untuk memindahkan sinar ke dalam bagian-bagian selanjutnya panjang gelombang akan dipilih oleh celah yang disebut sebagai slit. Monokromator akan berputar yang menyebabkan panjang gelombang yang melewati sampel kemudian instrumen akan terbaca pada saat melewati spektrum.

3. Optik-optik

Agar sumber sinar bisa melewati 2 kompartemen maka optik-optik dibuat dapat memecah sumber sinar, seperti pada tipe spektrofotometer *double-beam* larutan blanko dapat digunakan dalam memeriksa pembacaan maupun spektrum sampel pada satu kompartemen. Semua pelarut

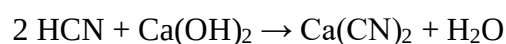
yang digunakan untuk melarutkan sampel maupun pereaksi digunakan sebagai blanko pada spektrofotometri (Gandjar & Rohman, 2017).

II.4. Cara-Cara Mengurangi Racun Pada Gadung

Racun sianida dalam gadung dapat dikurangi atau dihilangkan kadarnya dengan beberapa cara berikut (Utama & Rukismono, 2018):

1. Gadung terlebih dahulu dilakukan pengupasan pada bagian kulitnya, kemudian umbi gadung diiris kecil-kecil, dengan ketebalan kurang lebih 3 mm. Selanjutnya diberikan abu gosok hingga terbungkus dan merata sembari dilakukan peremasan pada potongan umbi gadung yang sudah terbungkus abu gosok dan didiamkan selama 1 malam. Setelah itu, dilakukan penjemuran hingga kering (kurang lebih 2 hari). Dilanjutkan dengan perendaman dengan air mengalir 2-3 hari atau didalam air tidak mengalir selama 3 hari dengan melakukan penggantian air setiap 6 jam. Langkah berikutnya dengan mencuci bersih dan menjemur hingga benar-benar kering.
2. Pertama-tama umbi gadung dikupas, setelah itu dilakukan pemotongan dan pengirisan berukuran kecil kira-kira 5 cm untuk panjangnya. Selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah dan diberikan garam dengan jumlah yang banyak, semisal 1 ember umbi gadung diberikan 2 kg garam. Setelah terbalut semua dengan garam, didiamkan selama 12 jam atau semalam dan setelahnya ditempatkan pada air yang mengalir dalam wadah yang memiliki rongga dengan tujuan mempermudah dalam penggantian air. Dilakukan penjemuran selama 1 hari hingga gadung dalam keadaan kering.
3. Pemeraman dengan menggunakan garam, dilakukan pemotongan gadung dan dilakukan proses pemeraman selama 7 hari. Proses terakhir dapat dilakukan dengan cara cuci bersih hasil pemeraman dan dilakukan proses pengeringan.
4. Pertama-tama umbi gadung dibersihkan sampai bersih dan dikupas ± 0.5 cm dan dilakukan pencucian kembali, selanjutnya diiris dengan ketebalan ± 0.3 cm dan direndam dengan menggunakan air kapur 15% selama 24 jam. Umbi yang sudah direndam kemudian ditiriskan dan dikeringkan (Siqhny dkk., 2020).

Proses netralisasi dengan melakukan penambahan zat yang bersifat basa merupakan salah satu cara alternatif untuk menurunkan kandungan sianida, dengan penambahan larutan kapur dipakai dalam menetralkan asam sianida yang dapat membentuk $(\text{Ca}(\text{CN})_2)$. Berikut ini merupakan proses reaksi antara asam sianida dengan kalsium hidroksida $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$:



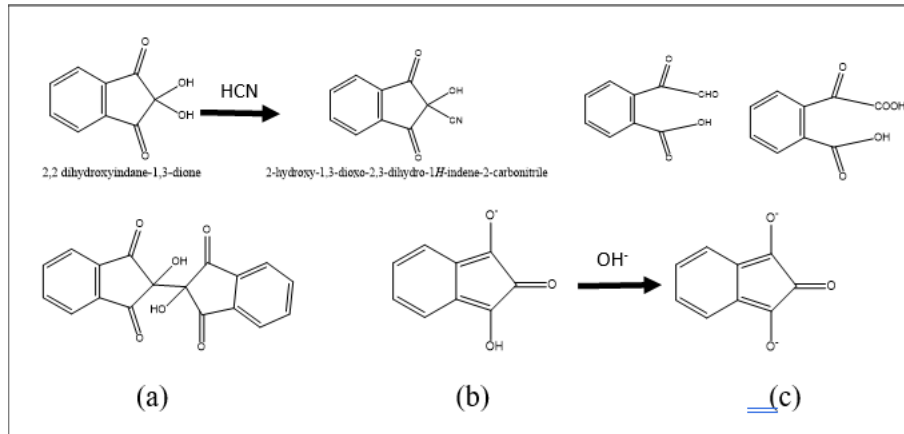
Reaksi asam sianida terhadap kalsium hidroksida menjadikan HCN mengalami penurunan. Pada saat dilarutkan menggunakan air kalsium hidroksida akan terurai menjadi Ca^{2+} dan OH^- , ion-ion yang terbentuk dari penguraian kalsium hidroksida bersifat seperti magent, dimana ion yang bermuatan negatif akan ditarik oleh ion basa seperti Ca^{2+} dan untuk ion yang memiliki muatan positif akan ditarik oleh ion OH^- . Sedangkan HCN akan terurai menjadi ion H^+ dan ion CN^- . Ion OH^- akan bereaksi dengan ion H^+ membentuk H_2O sedangkan pada ion CN^- akan bereaksi dengan Ca^{2+} membentuk $\text{Ca}(\text{CN})_2$ (Apsari dkk., 2018).

II.5. Metode Analisis Sianida

Beberapa metode analisis sianida yang dapat digunakan antara lain (Epa & Academy, 2017):

1. Melakukan destilasi selama 1 jam yang menjadikan sianida terlepas menjadi ion sianida yang ditampung dalam kondisi larutan basa. Kemudian untuk ion sianida yang tertampung dilakukan pengukuran dengan menggunakan titrimetric, kolorimetri ataupun elektroda ion selektif.
2. *Weak Acid Dissociable* (WAD) menggunakan destilasi, dimana metode ini menggunakan proses destilasi selama satu jam untuk menguapkan sianida dari sampel yang telah diatur pHnya menjadi pH 3 dengan larutan penyangga. Hasil asam sianida yang teruapkan diukur dengan titrimetri, kolorimetri atau dengan elektroda ion selektif.
3. WAD menggunakan asam pikrat dimana metode ini didasarkan pada pembentukan kompleks berwarna dengan asam pikrat dengan kehadiran nikel yang diikuti dengan pemanasan menggunakan penangas air selama 20 menit sebelum kemudian diukur dengan spektrofotometer ultra violet-visible.
4. Penentuan ion sianida menggunakan perak nitrat. Dimana pada metode ini dilakukan titrasi pada sampel dengan menggunakan larutan perak nitrat standar menggunakan indikator dimetilamino benzal rodamin.
5. Penentuan ion sianida menggunakan elektroda ion selektif. Dimana metode ini dilakukan pengujian secara langsung terhadap sampel menggunakan voltameter, dengan membandingkan pada elektroda referensi.
6. Penentuan sianida reaktif menggunakan tes USEPA SW-846. Sampel dalam jumlah sedikit ditempatkan pada asam sulfat kemudian dan selama 30 menit dilewatkan nitrogen secara berulang ke dalam sampel. Kemudian dilakukan pengukuran pada asam sianida yang terbentuk dari gas nitrogen yang dikumpulkan pada wadah yang berisi NaOH.
7. Penentuan sianida dengan menggunakan spektrofotometri sinar tampak pada umumnya menggunakan metode penambahan pereaksi ninhidrin pada sampel, pereaksi ninhidrin akan bereaksi dengan sianida dalam media cair untuk membentuk hidrindantin, yang terurai

dengan adanya natrium karbonat menghasilkan produk berwarna merah. Ketika ditambahkan natrium hidroksida akan terjadi perubahan warna menjadi biru pekat diperoleh dengan adanya pergeseran batokromik yang kuat dari 490 nm menjadi 590 nm dengan peningkatan intensitas (Nagaraja dkk., 2002). Mekanisme reaksi yang terjadi digambarkan pada gambar berikut ini:



Gambar 2.8. Reaksi ninhidrin dengan sianida

(Drochioiu dkk., 2002)

Dalam keadaan netral ninhidrin akan bereaksi dengan sianida membentuk hidrindantin yang tidak berwarna (gambar a), hindrindantin akan membentuk warna merah tua yang stabil pada media natrium karbonat (gambar b) dan membentuk warna biru pekat dalam penambahan media natrium hidroksida (Nagaraja dkk., 2002).

II.6. Validasi Metode

Berdasarkan *United States Pharmacopeia* (USP) validasi metode dilakukan agar analisis akurat, reproduibel, spesifik, dan tahan pada analit yang akan dianalisis pada metode terjamin. Validasi harus dilakukan pada metode analisis agar memverifikasi bahwa parameter kinerja yang digunakan cukup mampu menganggulangi permasalahan analisis. Maka dari itu, harus dilakukan validasi metode apabila:

- Metode yang baru dikembangkan dalam menanggulangi masalah pada analisis tertentu.
- Revisi terhadap metode yang sudah baku yang bertujuan dalam penyesuaian perkembangan maupun muncul suatu masalah yang mengarah pada metode baku harus direvisi.
- Penjaminan mutu terhadap metode baku yang menunjukkan perubahan dari waktu ke waktu.
- Digunakan metode baku pada laboratorium yang berbeda dan analisis yang melakukan berbeda maupun menggunakan alat yang berbeda.
- Untuk menunjukkan kesetaraan terhadap 2 metode, sebagai contoh antara metode baru dan metode baku (Gandjar & Rohman, 2017)

Terdapat 8 langkah dalam validasi metode analisis berdasarkan USP (*United States Pharmacopeia*), sebagai berikut ini (Gandjar & Rohman, 2017):

1. Presisi
2. Akurasi
3. Batas deteksi
4. Batas kuantifikasi
5. Spesifisitas
6. Linearitas dan rentang
7. Kekasaran (*Ruggedness*)
8. Ketahanan (*Robutness*).

Berbeda dengan USP, ICH (*International Conference on Harmanization*) mengklasifikasikan validasi metode sebagai berikut ini (Gandjar & Rohman, 2017):

1. Presisi
2. Akurasi
3. Batas deteksi
4. Batas kuantifikasi
5. Spesifisitas
6. Linearitas
7. Kisaran (*Range*)
8. Ketahanan (*Robutness*)
9. Kesesuaian Sistem.

II.6.1. Spesifisitas

Spesifisitas merupakan kemampuan dalam mengukur analit yang dimaksud secara tepat dan spesifik terhadap adanya komponen-komponen lain pada matriks sampel meliputi produk degradasi, ketidakmurnian, dan komponen matriks. Uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran merupakan 2 kategori spesifisitas yang dibagi menurut ICH. Dalam tujuan identifikasi, spesifisitas ditujukan terhadap kemampuan metode analisis dalam membedakan senyawa yang memiliki struktur yang hampir mirip. Pemisahan dua senyawa yang berdekatan merupakan tujuan spesifisitas dalam uji kemurnian maupun pengukuran kadar. Senyawa yang dimaksud merupakan komponen utama, komponen aktif maupun suatu pengotor dalam senyawa.

Metode pengujian harus tidak terpengaruh terhadap keberadaan pengotor pada saat pengujian yang didapatkan pengotor (*impurities*). Dapat digunakan 2 cara dalam menentukan spesifisitas metode yaitu dengan menggunakan optimasi dan menggunakan detektor selektif. Yang pertama

dilakukan optimasi untuk memperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa lain (resolusi senyawa yang dimaksud ≥ 2). Untuk cara yang kedua dengan menggunakan detektor selektif dilakukan pada senyawa yang terelusi secara bersamaan, sebagai contohnya detektor elektrokimia atau detektor fluoresen hanya dapat mendeteksi senyawa tertentu saja sedangkan senyawa lainnya tidak dapat terdeteksi. Dalam pengukuran selektifitas penggunaan detektor UV terhadap panjang gelombang tertentu pada analit merupakan cara yang efektif. Teknik derivatisasi dapat digunakan untuk meningkatkan selektifitas dalam mendeteksi analit menggunakan detektor UV dilakukan dengan cara pengukuran pada panjang gelombang tertentu yang spesifik terhadap derivat yang dihasilkan. Salah satu contoh yaitu pada pemakaian senyawa 4-dimetilaminoazobenzen- 4'-sulfonil klorida (DABS-Cl) untuk menderivatisasi asam amino dimana derivat yang terbentuk bisa terdeteksi menggunakan ultra violet pada panjang gelombang 436 nm (Gandjar & Rohman, 2017).

II.6.2. Linieritas

Linearitas adalah kemampuan metode untuk mendapatkan hasil-hasil uji yang secara langsung sesuai menggunakan konsentrasi analit pada konsentrasi yang diketahui. Linearitas pada suatu metode merupakan gambaran seberapa baik kurva kalibrasi yang didapatkan yang dapat menghubungkan respon (y) dengan konsentrasi (x). Linearitas dapat ditentukan dengan cara mengukur secara tunggal pada konsentrasi yang berbeda. Data yang diperoleh selanjutnya dengan menggunakan kuadrat kecil, kemudian ditentukan parameter linearitas meliputi nilai kemiringan (S , Slope), *intersep* (y) dan koefisien korelasinya (Gandjar & Rohman, 2017).

II.6.3. Batas Deteksi (*Limit Of Detection*, LOD)

Batas deteksi diartikan sebagai konsentrasi terendah analit pada sampel yang masih bisa terdeteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD yaitu batas uji yang secara khusus menunjukkan apakah suatu analit berada di atas atau dibawah nilai tertentu. Pengertian batas deteksi yang umum digunakan pada kimia analisis dinyatakan dalam kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko, yang ditambahkan menggunakan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$).

ICH memperkenalkan metode *signal to noise ratio*, walaupun begitu terdapat 2 pilihan metode lainnya yang digunakan oleh ICH yaitu metode instrumental visual dan menggunakan metode perhitungan. Metode non instrumental digunakan pada Teknik KLT dan metode titrimetric. Perhitungan LOD dapat dilakukan dengan menggunakan standar deviasi (SD) dan kemiringan (S , Slope) pada kurva baku dengan menggunakan rumus $LOD = 3,3 (SD/S)$. untuk mendapatkan standar deviasi respon dapat ditentukan menggunakan standar deviasi blanko sedangkan untuk

standar deviasi residual dapat ditentukan dengan menggunakan garis regresi ataupun standar deviasi intersep Y pada garis regresi (Gandjar & Rohman, 2017).

II.6.4. Batas Kuantifikasi (*Limit Of Quantification, LOQ*)

Batas kuantifikasi (limit of quantification, LOQ) diartikan sebagai konsentrasi terendah analit pada sampel yang bisa dipengaruhi oleh presisi atau akurasi dan dapat diterima pada kondisi operasional pada metode yang digunakan. Sama seperti LOD, LOQ dinyatakan dalam konsentrasi, dalam menentukan LOQ biasanya menggunakan signal to noise 10:1. Meskipun perhitungan dengan signal to noise ratio 10:1 pada LOQ sudah umum digunakan, perlu diingat bahwa LOQ merupakan konsentrasi yang dipersyaratkan dengan presisi dan akurasi. Maka apabila konsentrasi LOQ menurun, demikian pula presisi akan mengalami penurunan dan apabila presisi di syaratkan tinggi maka konsentrasi LOQ yang digunakan harus lebih tinggi.

Metode signal to noise ratio dikenalkan ICH, walaupun begitu sama seperti LOD, terdapat metode lain yang dapat dipilih dalam menentukan LOQ menurut ICH, yaitu metode non fragmental visual dan metode perhitungan. Untuk metode perhitungan didasarkan pada respon standar deviasi (SD) dan kemiringan (S,Slope) pada kurva baku yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus : $LOQ = 10(SD/ S)$. Standar deviasi respon dapat dipengaruhi oleh standar deviasi blanko dimana untuk standar deviasi residual ditetapkan dari persamaan garis regresi linear atau menggunakan standar deviasi intersep (y) pada persamaan garis regresi linear (Gandjar & Rohman, 2017).

II.6.5. Ketepatan (Akurasi)

Akurasi dinyatakan sebagai ketelitian pada metode analisis atau kedekatan antara nilai yang terukur dengan nilai yang diperoleh meliputi nilai konvensi, nilai sebenarnya maupun nilai rujukan. Spiking dilakukan pada sampel untuk mengetahui jumlah analit yang diperoleh kembali dalam pengukuran akurasi. Pada saat pemeriksaan senyawa obat, dilakukan perbandingan terhadap bahan rujukan *Standar Reference Material* (SRM) terhadap hasil pengukuran untuk mendapatkan nilai akurasi. Untuk dokumentasi nilai akurasi, ICH mengusulkan pengumpulan data menggunakan 3 konsentrasi yang berbeda dan 3 kali replikasi untuk mendapatkan 9 kali dari penetapan kadar, data yang didapat dinyatakan dalam nilai persen perolehan kembali (Gandjar & Rohman, 2017).

II.6.6. Presisi

Presisi yaitu ukuran keterulangan metode analisis yang dinyatakan dalam standar deviasi relatif berdasarkan jumlah sampel yang secara statistik berbeda secara signifikan. Mengacu pada ICH, presisi dilakukan pada 3 tingkat berbeda meliputi : keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan ketertiruan (*reproducibility*).

- a. Keterulangan adalah pada kondisi pengujian yang sama (berulang) mempunyai ketepatan baik meliputi orang, peralatan, tempat, maupun waktunya.
- b. Presisi antara adalah pada kondisi berbeda mempunyai ketepatan baik meliputi orang, peralatan, tempat, maupun waktunya.
- c. Ketertiruan mengacu pada hasil dari laboratorium yang lain.

Dokumentasi presisi harus meliputi: simpangan baku, simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV), dan kisaran kepercayaan. Parameter-parameter yang digunakan saat awal validasi metode pada pengujian presisi yaitu: keterulangan dan presisi antara. Pada saat akan melaksanakan studi banding dengan laboratorium lainnya biasanya dilakukan reproduibilitas. SD atau standar deviasi relatif (RSD) dinyatakan untuk nilai presisi. Untuk menghitung RSD dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$RSD = \frac{100 \times SD}{X}$$

Keterangan :

- X = Rata-rata data
- SD = Standar deviasi serangkaian data

Linearitas dan akurasi sering kali dikaji dengan menggunakan data yang digunakan pada pengujian presisi. Untuk senyawa tunggal masing-masing konsentrasi biasanya dilakukan 6-15 replikasi. Pada pengujian menggunakan KCKT, terhadap zat aktif dalam jumlah yang banyak nilai RSD dipersyaratkan pada rentang 1-2% sedangkan pada senyawa yang memiliki kadar sekelumit nilai RSD dipersyaratkan pada rentang 5-15% (Gandjar & Rohman, 2017).