

# VALIDASI DAN VERIFIKASI METODE UJI FOSFAT DENGAN SPEKTROFOTOMETER UVI-VIS DI LABORATORIUM KIMIA

Susiana Nurmalawati<sup>1)</sup> Charles Banon<sup>2)</sup>, Devirizanty<sup>3)</sup>,

Laboratorium Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu,

JL. Wr Supratman Kandang Limun Bengkulu 383711.

Laman: [www.fmipa.ac.id](http://www.fmipa.ac.id) email: fmipa-unib03@yahoo.com

susiana@unib.ac.id

## ABSTRAK

Uji Fosfat adalah salah satu parameter uji yang diajukan dalam pengajuan akreditasi FMIPA di laboratorium kimia. Uji ini juga memiliki kelengkapan alat dan bahan yang baik sehingga pelayanan pengujian dilakukan dengan penggunaan spektrofotometri yang tersedia. Sebagai salah satu parameter yang diujikan, selama ini belum dilakukan verifikasi metode uji untuk penentuan batas terendah fosfat yang dapat dideteksi oleh alat spektrofotometri, sehingga unjuk kerja dari pengujian belum diketahui, dan hasil keabsahan pengujian belum dapat dicapai. Dengan adanya kegiatan verifikasi ini, diharapkan dapat juga dikembangkan untuk penentuan validasi ataupun verifikasi pengembangan metode yang lain. Kegiatan pengujian fosfat merujuk pada metode baku SNI sehingga langkah verifikasi diterapkan. Verifikasi menggunakan pendekatan teknik statistik yang sesuai untuk penerapannya dan relevan dengan perubahan pengujian. Uji verifikasi dan validasi memiliki parameter uji statistik yang sama, diantaranya: Simpangan deviasi, Nilai keberterimaan pengujian melalui uji Horwitz, dan penetapan presisi dan akurasi dengan menggunakan acuan CRM (Certified Reference Material) bahan PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Pada percobaan kali dihasilkan data untuk deteksi batas terendah yang dapat diukur dengan baik oleh alat spektrofotometri UV-Vis Cary 60 sebesar 0,0660 mg P/L, dan uji presisinya memiliki keberterimaan yang baik. Kedepannya validasi dan verifikasi metode uji dapat menjadi salah satu penunjang persyaratan laboratorium kimia sebagai laboratorium uji yang menerapkan ISO 17025.

**Kata Kunci:** Spektrofotometer UV-Vis, validasi dan verifikasi metode uji

## ABSTRACT

*Phosphate Test is one of the test parameters proposed in the application for FMIPA accreditation in the chemical laboratory. This test was chosen because it has good equipment and materials so that testing services can be carried out using a UV-Vis Spectrophotometer. As one of the parameters being tested, so far no verification of the test method has been carried out for determining the lowest limit of phosphate that can be detected by spectrophotometry, so that the performance of the test is not yet known, and the results of the validity of the test have not been achieved. With this verification activity, it is hoped that it can also be developed for the determination of validation or verification of the development of other methods. Phosphate testing activities refer to the standard SNI method so that verification steps are applied. Verification uses a statistical engineering approach that is appropriate for its application and relevant to test changes. Verification and validation tests have the same statistical test parameters, including: Deviation deviation, Test acceptability value through Horwitz test, and determination of precision and accuracy using CRM (Certified Reference Material) PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. In this experiment, the data for the detection of the lowest limit that can be measured properly by the UV-Vis Cary 60 spectrophotometer was 0.0660 mg P/L, and the precision test had good acceptability. In the future, validation and verification of test methods can be one of the supporting requirements for chemical laboratories as test laboratories that apply ISO 17025.*

**Keywords:** Spektrofotometer UV-Vis, validation and verification methods

## PENDAHULUAN

Laboratorium Kimia memiliki peranan sangat penting bagi kegiatan pendidikan, penelitian, dan pengabdian masyarakat. Salah satu tugas Pranata Laboratorium Pendidikan adalah pelayanan pengujian. Standarisasi pengujian sampel sebagai salah satu bentuk pelayanan kepada masyarakat memerlukan pengakuan untuk peningkatan pengujiannya. Pengakuan akan kemampuan laboratorium dalam melakukan pengujian suatu parameter dapat dilakukan melalui rangkaian kegiatan verifikasi dan validasi suatu metode. Fosfat adalah salah satu parameter uji yang diajukan dalam pengajuan akreditasi FMIPA di laboratorium kimia. Pengujian fosfat menggunakan metode baku SNI 06-6989-31-2005. Dipilihnya metode ini sebagai bahan acuan kegiatan validasi dan verifikasi, diantaranya, uji ini juga memiliki kelengkapan alat dan bahan yang baik sehingga pelayanan pengujian dilakukan dengan penggunaan spektrofometri UV-Vis Cary 60 yang tersedia. Pada Metode uji juga dilengkapi dengan penjabaran persyaratan jaminan mutu yang digunakan dan batas keberterimaan hasil pengujiannya. Pembuatan varian standar dalam metode uji ini juga menggunakan batas konsentrasi yang tidak terlalu kecil sehingga dapat mudah dilakukan dengan peralatan gelas yang terdapat dilaboratorium.

Pada Verifikasi dan validasi metode fosfat ini pendekatan teknik statistik dipakai untuk penerapannya dan pemilihannya relevan dengan perubahan pengujian. Uji verifikasi dan validasi memiliki parameter uji statistik yang sama, diantaranya: Limit Deteksi Metode, Nilai keberterimaan pengujian melalui uji Horwitz, dan penetapan presisi dan akurasi dengan menggunakan acuan CRM (Certified Reference Material) bahan  $PO_4^{2-}$ . Kedepannya validasi dan verifikasi metode uji dapat menjadi salah satu penunjang persyaratan laboratorium kimia sebagai laboratorium uji yang menerapkan ISO 17025.

## METODE

### Bahan habis pakai

#### Alat dan Bahan

##### Alat

- |                         |                           |
|-------------------------|---------------------------|
| 1. Spektrometri UV –Vis | 6. Gelas Piala            |
| 2. Neraca Analitik      | 7. Corong                 |
| 3. Erlenmeyer           | 8. Pipet Volumetrik 10 ml |
| 4. Labu ukur            | 9. Gelas ukur             |

Pipet tetes

##### Bahan

- Larutan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 5 N  
Dimasukkan secara hati-hati 70 ml asam sulfat pekat ke dalam gelas piala yang berisi 300 ml air suling dan diletakkan pada penangas air es. Encerkan larutan dengan air suling sampai 500 ml dan dihomogenkan.
- Larutan kalium antimonil tartrat.  
Dilartukan 1,3715 g kalium antimonil tartrat dengan 400 ml air suling dalam labu ukur 500 ml. Kemudian ditambahkan air suling hingga tepat tanda tera dan dihomogenkan.
- Larutan ammonium molibdat.  
Dibuat larutan ammonium molibdat dengan melartukan 20 g ammonium molibdat dalam 500 ml air suling dan homogenkan.
- Larutan asam askorbat.  
Dilartukan 1,76 g asam askorbat dalam 100 ml air suling.
- Larutan campuran.  
Campurkan secara berturut-turut 50 ml  $H_2SO_4$  5 N, 5 ml larutan kalium antimonil tartrat, 15 ml larutan ammonium molibdat dan 30 ml larutan asam askorbat
- Kalium dihidrogen fosfat anhidrat.

## Instrumentasi



**Gambar 3.** Alat Spektrofotometer UV – Vis Cary 60

- Spesifikasi Alat
- Spectrophotometer UV Vis cary 60 single beam
- Produksi : [Agilent Technologies](http://www.agilent.com)
- Range Panjang gelombang 190–1100 nm
- Sumber Cahaya lampu Xenon

## Prosedur penelitian

1. Pembuatan Larutan Induk Fosfat 500 mg/L
  1. Dilarutkan 2,195 g kalium dihidrogen fosfat anhidrat/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dengan 100 ml air suling dalam labu ukur 1000 ml.
  2. Tambahkan air suling sampai tepat pada tanda tera dan dihomogenkan.
2. Pembuatan Larutan Baku Fosfat 10 mg P/L  
Pipet 2 ml larutan induk fosfat 500 mg P/L dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, tambahkan air suling sampai tepat pada larutan tera dan dihomogenkan.
3. Pembuatan Larutan Kerja Fosfat.
  1. Pipet 0 ml; 5ml; 10 ml; 20ml; dan 25 ml larutan baku fosfat yang mengandung 10 mg P/L dan masukkan masing-masing kedalam labu ukur 250 ml.
  2. Tambahkan air suling sampai tepat tanda tera kemudian dihomogenkan sehingga kadar fosfat 0,0 mg P/L; 0,2 mg P/L; 0,4 mgP/L; 0,8 mg P/L; dan 1,0 mg P/L
4. Pembuatan Kurva kalibrasi.
  1. Optimalkan alat spektrofotometer sesuai dengan petunjuk alat untuk pengujian kadar fosfat.
  2. Pipet 50 ml larutan kerja dan masukkan masing-masing kedalam erlenmeyer.
  3. Tambahkan 1 tetes indikator fenolftalin. Jika terbentuk warna merah muda, tambahkan tetes demi tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N sampai warna hilang.
  4. Tambahkan 8 ml larutan campuran dan dihomogenkan.
  5. Masukkan kedalam kuvet pada alat spektrofotometer baca dan catat serapan pada panjang gelombang 880 nm dalam kisaran waktu antara 10 menit sampai 30 menit.
  6. Buat kurva kalibrasi dan tentukan persamaan garis lurusnya.
5. Jaminan mutu dan Kontrol akurasi
  1. Lakukan analisis CRM untuk kontrol akurasi dalam hal digunakan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  terstandar.
  2. Gunakan alat gelas bebas kontaminan
  3. Gunakan alat ukur terkalibrasi
  4. Dikerjakan analisis berkompeten
  5. Lakukan analisis dalam waktu yang tidak melampaui waktu penyimpanan maksimum.

Cara Kerja:

A. Penentuan Limit Deteksi Metode (*Methods Detection Limit, MDL*) dan Limit Quantifikasi (LoQ)

1. Dibuat larutan dengan konsentrasi 0,2 mg P/L untuk penetapan limit deteksi dari bahan CRM Potasium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ke dalam labu ukur 50 mL .
2. Diukur ke sepuluh larutan tersebut pada panjang gelombang 880 nm. Catat hasil pengukuran dan hitung konsentrasi masing-masing larutan dengan menggunakan persamaan garis lurus yang diperoleh dari kurva kalibrasi.
3. Hitung kadar rata-rata, standar deviasi, %RSD, Signal to Noise (S/N), MDL, LoQ menggunakan Excel
4. Bandingkan hasil perhitungan dengan persyaratan yang ditentukan.
5. Penentuan Presisi dengan Repeatabilitas dan Akurasinya.

Pengujian presisi dan akurasi dengan cara mengukur sampel uji yang di tentukan pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi pada daerah kerja metode pengujian. Dibuat larutan dari bahan CRM Potasium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) sesuai varian kadar yang ditentukan. Pembuatan variasi larutan uji adalah 0,2 ppm ; 0,5 ppm ; dan 0,8 ppm sebanyak 10 buah setiap varisi konsentersasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pelaksanaan penelitian validasi dan verifikasi uji fosfat dengan metode SNI SNI 06-6989-31-2005 dari bulan Juni 2021 menghasilkan beberapa data sebagai berikut:

No	Konsentrasi	Absorbansi
1	0	0,0004
2	0,2	0,036
3	0,4	0,0755
4	0,6	0,1244
5	0,8	0,141
6	1	0,1958
7	1,2	0,2423

**Tabel 1.** Data deret standar Fosfat



**Gambar 1.** Kurva regresi deret standar fosfat

Dari pembacaan grafik diatas, diperoleh persamaan  $y = 0,1954x$  dan nilai  $R^2 = 0,9918$ . Kesimpulannya nilai  $R^2 = \geq 0,990$  sehingga memenuhi batas keberterimaan lineritas kurva. Selanjutnya dilakukan uji lineritas kurva dengan menggunakan analysis of varian , maka dihasilkan kesimpulan dibawah ini.

**Tabel 2.** Analisis Data Analisis of varian

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,996049746
R Square	0,992115097
Adjusted R Square	0,990538116
Standard Error	0,008369298
Observations	7

ANOVA

	<i>Df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	0,044067023	0,04406702	629,123177	1,87974E-06
Residual	5	0,000350226	7,00451E-05		
Total	6	0,044417249			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	-0,002529	0,005703	-0,443398	0,676006	-0,017188	0,012131	0,012131
Variable1	0,198357	0,007908	25,082328	0,000002	0,178028	0,218686	0,218686

Evaluasi	Persyaratan	Hasil	kesimpulan
Nilai F	F<0,05	1,87974E-06	memenuhi
Nilai regresi	R <sup>2</sup> >0,995	0,992115097	memenuhi
intercept	<0,19835	0,012130724	memenuhi

**Penetapan Limit Deteksi Metode / Nilai MDL**

Dilakukan penetapan nilai limit deteksi metode dengan cara pembuatan larutan dengan konsentrasi 0,2 mg P/L dari bahan K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> yang terstandar ( CRM ). Dihasilkan data dibawah ini.

**Tabel 3.** Data MDL Analisis data secara statistik

No	Kadar P (ppm)	y (absorbansi)	a (slope)	x (kadar P hitung)
1	0,2	0,0392	0,1954	0,200614125
2	0,2	0,0396	0,1954	0,202661208
3	0,2	0,0403	0,1954	0,206243603
4	0,2	0,0406	0,1954	0,207778915
5	0,2	0,0476	0,1954	0,243602866
6	0,2	0,0306	0,1954	0,156601842
7	0,2	0,0415	0,1954	0,212384852
8	0,2	0,0441	0,1954	0,225690890
9	0,2	0,0410	0,1954	0,209825998
10	0,2	0,0392	0,1954	0,200614125

No	Kadar (mg/L)		%R
	Pembacaan	Perhitungan	
1	0,2	0,2006141	100,31
2	0,2	0,2026612	101,33
3	0,2	0,2062436	103,12
4	0,2	0,2077789	103,89
5	0,2	0,2436029	121,80
6	0,2	0,15666018	78,33
7	0,2	0,2123849	106,19
8	0,2	0,2256909	112,85
9	0,2	0,209826	104,91
10	0,2	0,2006141	100,31
Rerata(x)		0,2066	103,30
Sd		0,0220	
%RSD=(sd/X)		10,6534	
S/N = x/sd		9,3867	
MDL= 3 sd		0,0660	
LoQ= 10 sd		0,2201	

Evaluasi hasil

**Tabel 4.** Perhitungandan MDL

No	Persyaratan	Hasil	Kesimpulan
1	%RSD = 15,16	10,65	Memenuhi
2	%R = 75% - 120%	100,36	Memenuhi
3	s/N = 2,5 - 10	9,39	Memenuhi
4	MDL < Kadar spike	0,0692<0,2	Memenuhi
5	Kadar spike < 10 MDL	0,2<0,692	Memenuhi
6	MDL < BML	0,0692<0,2	Memenuhi
7	jika MDL diterima, maka LoQ = 10 sd diterima		

Pada Penetapan Limit Deteksi Metode ini adalah penetapan batas konsentrasi terkecil dari fosfat yang dapat diukur oleh Spektrofotometer UV-Vis Cary 60. Dan dari hasil didapatkan bahwa batas konsentrasi P terkecil adalah 0,0687. Dari tabel juga terlihat bahwa pengukuran MDL ini memiliki rentang sinyal kesalahan sebesar 9,38%. Kesalahan ini harus ditelusuri kembali karena faktor khususnya kesalahan acak yaitu kesalahan alat gelas yang digunakan, kesalahan ketrampilan uji, dan kesalahan instrumen dari segi kalibrasinya yang belum dilakukan kalibrasi karena kurangnya sumberdaya kompetensi instrumen analitik, dan ketersediaan peralatan gelas yang memenuhi standar untuk pengujian. Jika dilihat dari usia instrumen, spektrofotometer ini masih termasuk kategori baru, yaitu Instrumen analitik yang bersal dari Dana APBN Tahun 2012, sehingga tidak menutup kemungkinan risiko kesalahan dari faktor ini sangat sedikit.

#### Penetapan Presisi

Dilakukan uji presisi dengan cara pembuatan larutan dari bahan  $K_2HPO_4$  yang terstandar ( CRM) pada konsentrasi rendah = 0, 2 ppm; sedang = 0,5 ppm: dan tinggi = 0,8 ppm.

**Tabel 5.** Perhitungandan Presisi kadar P = 0,2 ppm

Analisis Data Presisi kadar P = 0,2 ppm

No	Kadar (mg/L)		%R (75-120)	Kesimpulan
	Pembacaan	Perhitungan		
1	0,2	0,200614125	100,3071	Diterima
2	0,2	0,202661208	101,3306	Diterima
3	0,2	0,206243603	103,1218	Diterima
4	0,2	0,207778915	103,8895	Diterima
5	0,2	0,243602866	121,8014	Diterima
6	0,2	0,156601842	78,3009	Diterima
7	0,2	0,212384852	106,1924	Diterima
8	0,2	0,22569089	112,8454	Diterima
9	0,2	0,209825998	104,9130	Diterima
10	0,2	0,200614125	100,3071	Diterima
	Rerata(x)	0,20660	<b>103,3009</b>	Diterima
	Standar deviasi (sd)	0,02203		
	%RSD=(sd/X)	10,66078		
	0.67 CVhorwitz	13,5918		
	%RSD<0.67 CVhorwitz		Diterima	

C	log C	1-0,5 log C	$2^{1-0.5\log C}$	HorRat Value
0,2066	-6,6849	4,3424	20,2863	0,52552

Tabel 6. Perhitungan Presisi kadar P = P= 0,5 ppm

Presisi Kadar P= 0,5 ppm

Presisi Kadar P= 0,5 ppm

No	Kadar P (ppm)	y (absorbansi)	a (slope)	x (kadar P hitung)
1	0,5	0,1005	0,1954	0,514329580
2	0,5	0,1018	0,1954	0,520982600
3	0,5	0,1041	0,1954	0,532753327
4	0,5	0,1043	0,1954	0,533776868
5	0,5	0,1047	0,1954	0,535823951
6	0,5	0,1042	0,1954	0,533265097
7	0,5	0,1045	0,1954	0,534800409
8	0,5	0,1053	0,1954	0,538894575
9	0,5	0,1051	0,1954	0,537871034
10	0,5	0,1048	0,1954	0,536335722

Analisis secara statistik

	Kadar (mg/L)		%R (80-115)	Kesimpulan
	Pembacaan	Perhitungan		
	0,5	0,51432958	102,86592	Diterima
	0,5	0,5209826	104,19652	Diterima
	0,5	0,532753323	106,55066	Diterima
	0,5	0,533776868	106,75537	Diterima
	0,5	0,535823951	107,16479	Diterima

0,5	0,533265097	106,65302	Diterima
0,5	0,534800409	106,96008	Diterima
0,5	0,538894575	107,77892	Diterima
0,5	0,537871034	107,57421	Diterima
0,5	0,536335722	107,26714	Diterima
Rerata(x)	0,53188	<b>106,3767</b>	Diterima
Standar deviasi (sd)	0,00790		
%RSD=(sd/X)	<b>1,48581</b>		
0.67 CVhorwitz	11,7886		
%RSD<0.67 CVhorwitz			Diterima

C	log C	1-0,5 log C	$2^{1-0,5\log C}$	HorRat Value
0,5319	-6,2742	4,1371	17,5950	0,08445

**Tabel 7.** Perhitungan Presisi kadar P = P= 0,8 ppm

**Presisi Kadar P= 0,8 ppm**

No	Kadar P (ppm)	y (absorbansi)	a (slope)	x (kadar P hitung)
1	0,8	0,1615	0,1954	0,826509724
2	0,8	0,1469	0,1954	0,751791198
3	0,8	0,1598	0,1954	0,817809621
4	0,8	0,1619	0,1954	0,828556807
5	0,8	0,1611	0,1954	0,824462641
6	0,8	0,1617	0,1954	0,827533265
7	0,8	0,1617	0,1954	0,827533265
8	0,8	0,1622	0,1954	0,830092119
9	0,8	0,1620	0,1954	0,829068577
10	0,8	0,1616	0,1954	0,827021494

Analisis secara statistik

Kadar (mg/L)		%R (80-115)	Kesimpulan
Pembacaan	Perhitungan		
0,8	0,826509724	103,3137155	Diterima
0,8	0,751791198	93,97389975	Diterima
0,8	0,817809621	102,2262026	Diterima
0,8	0,828556807	103,5696009	Diterima
0,8	0,824462641	103,0578301	Diterima
0,8	0,827533265	103,4416581	Diterima
0,8	0,827533265	103,4416581	Diterima
0,8	0,830092119	103,7615149	Diterima
0,8	0,829068577	103,6335721	Diterima
0,8	0,827021494	103,3776868	Diterima
Rerata(x)	0,81904	102,3797	Diterima
Standar deviasi (sd)	0,02388		
%RSD=(sd/X)	<b>2,91507</b>		
0.67 CVhorwitz	11,0470		



%RSD<0.67 CVhorwitz	Diterima
---------------------	----------

C	log C	$1-0,5 \log C$	$2^{1-0.5 \log C}$	HorRat Value
0,8190	-6,0867	4,0433	16,4880	0,17680

## KESIMPULAN

Kesimpulan berisikan tentang ringkasan hasil penelitian, tanpa tambahan interpretasi baru lagi dan dapat juga dituliskan kelebihan dan kekurangan dari penelitian, serta rekomendasi untuk penelitian selanjutnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Rohman.(2016).Validasi dan Penjaminan Mutu Metoda Analisis Kimia. Yogyakarta : Penerbit Gadjah Mada University Press.
- Anwar Hadi.(2018).Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian & Laboratorium Kalibrasi.Jakarta : Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Anom Irawan. Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran Dalam Kegiatan Penelitian Dan Pengujian.Indonesian Journal of Laboratory.2019, Volume 1, Hal. 1-9
- Ardhaningtyas Riza Utami. Verifikasi Metode sulfat Dalam Air dan Air Limbah sesuai SNI 6989 .20 :2019. Jurnal Teknologi Proses dan Inovasi Industri.2017, Volume 2, Hal. 1- 7
- Astari Simbolon Monica Magdalena, Aman Sentosa Panggabean, Moh.Syaiful Arif. Validasi Penentuan Cadmium(Cd) pada Pupuk Organik Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) di PT.Global Environment Laboratory Prosiding Seminar Nasional Kimia Lingkungan.2020.
- Eurachem, The Fitness For Purpose of Analytical Methods, 2<sup>nd</sup> ed, 2014
- Hendayana Sumar.(2006).Buku Materi Instrumen Analitik . Jakarta.Penerbit Universitas Terbuka.
- SNI 06-6989-31-2005 Air dan Limbah : Cara Uji Fosfat secara S0ektrofotometri. Badan Standard Nasional.
- Riyanto.(2014).Validasi danVerifikasi Metode Uji. Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi.Yogyakarta. Penerbit deepublish.
- Validasi danVerifikasi Metode Uji. Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi.Yogyakarta. Penerbit deepublish.