

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Beberapa metode analisis atenolol yang telah dilaporkan dalam tujuh tahun terakhir ini antara lain adalah pada tahun 2010, Kavitha dan Muralidharan melakukan analisis atenolol menggunakan fase terbalik KCKT menghasilkan parameter validasi yang baik yaitu nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9994 dan nilai *Relative Standard Deviation* (RSD) yang diperoleh dari presisi adalah 0,858%. Elgawish dkk. pada Oktober 2011 melakukan penelitian atenolol dalam plasma menggunakan KCKT, nilai parameter validasi yang dihasilkan adalah koefisien korelasi (r) sebesar 0,998, dan rata-rata persen *recovery* dari tiga konsentrasi rendah, sedang dan tinggi secara berurutan adalah 94,54; 95,3; dan 98,24%.

Analisis atenolol kembali dilakukan pada tahun 2012, oleh Shelke dkk. menggunakan spektrofotometri UV dengan menunjukkan nilai parameter validasi adalah rata-rata persen *recovery* sebesar 101,66%, RSD dari presisi *intraday* dan *interday* secara berurutan sebesar 1,4676% dan 1,9303%, serta koefisien korelasi (r) 0,999. Pada tahun 2013 dilakukan kembali analisis atenolol dalam *bulk* dan sediaan farmasi menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT) oleh Patel dkk. dengan nilai parameter validasi adalah koefisien relasi sebesar 0,997, rata-rata persen *recovery* sebesar 100,10%, presisi *interday* 0,0027% dan *intraday* 0,0030%. Penambahan densitometer pada metode KLT dilakukan sejak tahun 1970-an dengan tujuan pengembangan metode KLT yang sederhana menjadi lebih akurat dan teliti hasil analisisnya. Salah satunya hasil penelitian yang bersumber dari El-Kimary, E. pada tahun 2014 bahwa nilai-nilai parameter yang diperoleh sangat memuaskan, untuk range nilai hasil akurasi yang diperoleh adalah 95,98-105,27% dan untuk nilai presisi yang didasarkan pada %RSD yaitu di bawah 8,98%. Perbedaan penelitian yang akan dilakukan pada saat ini adalah obat yang digunakan. Pada penelitian ini yang dianalisis adalah obat atenolol.

B. Landasan Teori

1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT pertama kali digunakan untuk pemisahan yaitu pada tahun 1938 oleh Izmailoff Schraiber. KLT merupakan salah satu dari bagian kromatografi planar, kertas dan elektroforesis. Pada KLT fase diamnya berupa lapisan yang seragam pada permukaan bidang datar yang terbuat dari lempeng kaca, plat aluminum atau bahkan plat dari plastik.

KLT merupakan cara pemisahan campuran untuk mendapatkan senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya. KLT dapat dipakai dengan dua tujuan, pertama dipakai selayaknya sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, atau preparatif. Kedua, sebagai uji pendahuluan untuk optimasi sistem fase gerak dan sistem fase diam yang akan dipakai dalam kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi.

KLT dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida-lipida dan hidrokarbon yang sukar dikerjakan dengan kromatografi kertas. KLT juga dapat berguna untuk mencari eluen untuk kromatografi kolom, analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni skala kecil. Bahan lapisan tipis seperti silika gel adalah senyawa yang tidak bereaksi dengan pereaksi – pereaksi yang lebih reaktif seperti asam sulfat.

Data yang diperoleh dari KLT adalah nilai R_f yang berguna untuk identifikasi senyawa. Nilai R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai R_f dari senyawa standar. Nilai R_f dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu bilangan R_f selalu lebih kecil dari 1.

a. Pelaksanaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Menurut Farmakope Indonesia Edisi Keempat, alat dan bahan untuk pelaksanaan KLT adalah sebagai berikut:

1) Fase diam

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya. Pada KLT, zat penjerap merupakan lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, plastik atau logam secara merata, umumnya digunakan lempeng kaca. Lempeng yang dapat dianggap sebagai kolom kromatografi kolom yang terbuka dan pemisahan yang tercapai dapat didasarkan pada adsorpsi, partisi atau kombinasi kedua efek, tergantung jenis penyangga, cara pembuatan, dan jenis pelarut yang digunakan. KLT dengan lapis tipis penukar ion dapat digunakan untuk pemisahan senyawa polar. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan bercak dengan harga R_f yang identik dan ukuran yang hampir sama, dengan menolkan zat uji dan baku pembanding pada lempeng yang sama. Pembandingan visual ukuran bercak dapat digunakan untuk memperkirakan kadar secara semi kuantitatif (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Penjerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa, sementara mekanisme penjerapan yang utama pada KLT adalah adsorpsi dan partisi. Beberapa penjerap fase diam yang digunakan pada KLT dapat dilihat pada tabel 2.1 (Gandjar dan Rohman, 2013).

Tabel 2.1. Beberapa penjerap fase diam yang digunakan pada KLT

Penjerap	Mekanisme	Penggunaan
Silika gel	Adsorpsi	Asam amino, hidokarbon, alkaloid, vitamin.
Silika modifikasi dengan hidrokarbon	Partisi termodifikasi	Senyawa-senyawa non polar
Serbuk selulosa	Partisi	Asam amino, nukleotida, karbohidrat.
Alumina	Adsorpsi	Hidrokarbon, pewarna makanan, alkaloid, ion logam.
Kieselgur	Partisi	Gula dan asam-asam lemak.
Selulosa penukar ion	Penukar ion	Asam nukleat, nukleotida, halida, ion logam.
Gel sephadex	Eksklusi	Polimer, kompleks logam, dan protein.
Beta-siklodekstrin	Interaksi adsorpsi stereospesifik	Campuran enantiomer

(Kealey dan Haines, 2002)

2) Fase gerak

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak:

- a) Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
- b) Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga nilai R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- c) Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzena akan meningkatkan harga R_f secara signifikan.

d) Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase gerak, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau ammonia masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam (Gandjar dan Rohman, 2013).

3) Aplikasi (penotolan) sampel

Untuk memperoleh reproduibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μ l menggunakan pipet mikro berskala (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Jika volume sampel yang ditotolkan lebih besar dari 2-10 μ l, maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

4) Pengembangan

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel dalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi dengan uap fase gerak. Bejana kromatografi dapat memuat satu atau lebih lempeng kaca/lempeng siap pakai dan dapat ditutup kedap. Bejana baiknya dari kaca, baja tahan karat atau porselen, dan dirancang sedemikian, hingga dapat dilakukan pengamatan selama kromatografi berlangsung, tanpa membuka bejana (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Tepi bagian bawah lempeng tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan kedalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang telah berisi totolan sampel.

Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin (akan tetapi harus mampu melulusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang telah ditentukan. Untuk melakukan penjenuhan fase gerak, biasanya bejana dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung dari kertas saring, maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh (Gandjar dan Rohman, 2013).

5) Deteksi bercak

Deteksi bercak pada KLT dapat dilakukan secara kimia dan fisika. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan denagan cara pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet. Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi, membuat bercak akan terlihat jelas. Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak:

- a) Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.
- b) Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 nm (panjang gelombang pendek) atau 366 nm (panjang gelombang panjang) untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa flourosensi yang tidak larut yang dimasukkan ke dalam fase diam untuk memberikan dasar fluoresensi atau dapat pula dengan menyemprot lempeng dengan reagen fluoresensi setelah dilakukan pengembangan.
- c) Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.

- d) Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam *chamber* tertutup.
- e) Melakukan *scanning* pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrument yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (*peak*) dalam pencatatan (*recorder*) (Gandjar dan Rohman, 2013).

6) Perhitungan nilai R_f

Perhitungan nilai R_f didasarkan atas rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Nilai R_f dinyatakan hingga angka 1. Beberapa pustaka menyatakan nilai R_f yang baik yang menunjukkan pemisahan yang cukup baik adalah berkisar antara 0,2-0,8.

7) Alternatif prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Adanya variasi prosedur pengembangan KLT dilakukan untuk meningkatkan resolusi, sensitifitas, kecepatan, reproduksibilitas dan selektifitas. Beberapa pengembangan ini meliputi KLT 2 dimensi, pertama pengembangan *continue* dan pengembangan gradien.

KLT 2 dimensi atau 2 arah ini bertujuan untuk meningkatkan resolusi sampel ketika komponen-komponen solut mempunyai karakteristik kimia yang hampir sama, karenanya nilai R_f juga hampir sama sebagaimana dalam asam-asam amino. Selain itu, sistem 2 fase gerak yang sangat berbeda dapat digunakan secara berurutan pada suatu campuran sehingga memungkinkan untuk melakukan pemisahan analit yang mempunyai tingkat polaritas yang berbeda.

Pengembangan *continue* dilakukan dengan cara mengalirkan fase gerak secara terus menerus pada lempeng KLT

melalui suatu wadah (biasanya alas tangki) melalui suatu lapisan dan dibuang dengan cara tertentu pada ujung lapisan.

Pengembangan gradient dilakukan dengan menggunakan komposisi fase gerak yang berbeda-beda. Tujuan utama sistem ini adalah untuk mengubah polaritas fase gerak. Meskipun demikian untuk memperoleh komposisi fase gerak yang reproduibel sangatlah sulit (Gandjar dan Rohman, 2013).

b. Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Penggunaan umum KLT adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektivitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, serta memantau kromatografi kolom, melakukan *screening* sampel untuk obat.

Pengukuran kuantitatif dimungkinkan, bila digunakan densitometri, floresensi atau pepadaman flouresensi. Bercak juga dapat dikerok dari lempeng, kemudian diekstraksi dengan pelarut yang sesuai dan diukur secara spektrofotometri (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995). Analisa kualitatif dengan KLT dapat dilakukan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai R_f . Analisis kuantitatif dilakukan dengan dua cara, yaitu mengukur bercak langsung pada lempeng dengan menggunakan ukuran luas atau dengan teknik densitometri dan cara berikutnya adalah dengan mengerok bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat dalam bercak dengan metode analisis yang lain, misalnya dengan metode spektrofotometri. Dan untuk analisis preparatif, sampel yang ditotolkan dalam lempeng dengan lapisan yang besar lalu dikembangkan dan dideteksi dengan cara yang nondestruktif. Bercak yang mengandung analit yang dituju selanjutnya dikerok dan dilakukan analisis lanjutan.

KLT dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan jenis kromatografi lainnya. Termasuk alat-alat yang digunakan dalam pelaksanaan. Penggunaan KLT, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan hampir semua laboratorium dapat melaksanakan saat secara tepat dan akurat.

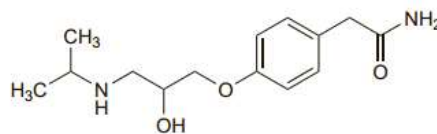
Beberapa keuntungan dari KLT:

- 1) Banyak digunakan untuk tujuan analisis
- 2) Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet.
- 3) Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak (Gandjar dan Rohman, 2013).

2. Atenolol

Atenolol, 4-[2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]-benzeneacetamide adalah agen pemblokir reseptor adrenergik kardioselektif yang digunakan untuk terapi hipertensi, angina pectoris, dan infark miokardial (Dewi dan Martono, 2013).

Atenolol ($C_{14}H_{22}N_2O_3$) memiliki bobot molekuler yaitu 266,34. Pemerian atenolol adalah serbuk putih atau hampir putih dan tidak berbau atau hampir tidak berbau. Kelarutan atenolol adalah agak sukar larut dalam air, larut dalam etanol mutlak, praktis tidak larut dalam eter. Atenolol memiliki titik didih sekitar 152-155°C dan rotasi optik milik atenolol adalah +0,10° hingga -0,10° serta konstanta disosiasi (pKa) milik atenolol adalah 9,6 pada suhu 24°C. Selain data mengenai sifat fisika dan kimia, data farmakokinetika atenolol dapat dilihat pada tabel 2.2.



Gambar 2.1. Atenolol (Martindale, 2009)

Beberapa obat golongan *beta-blocker* memiliki aksi langsung pada sistem kardiovaskular. Obat golongan *beta-blocker* dapat menurunkan kontraktilitas jantung dan *output* sehingga detak jantung menjadi rendah mendekati normal, menekan pelepasan adrenergik pada saraf simpatik, menghambat pelepasan norepinefrin pada saraf tepi dan menurunkan jumlah pengeluaran renin dari ginjal, semua hal tersebut sangat berperan dalam mekanisme penurunan tekanan darah (Koda-Kimble dkk., 2009).

Tabel 2.2. Profil Farmakokinetika Atenolol

No	Parameter	Keterangan
1.	Onset	Puncak aksi atenolol terjadi pada 2-4 jam.
2.	Durasi	Untuk individu yang fungsi ginjalnya masih normal, memerlukan waktu 12-24 jam.
3.	Absorpsi	Tidak sempurna
4.	Distribusi	Lipofilisitas rendah dan tidak dapat melewati sawar darah otak.
5.	Ikatan Protein	3% sampai dengan 15%
6.	Metabolisme	Sedikit termetabolisme di hati
7.	Eliminasi waktu paruh	
	Neonatus	35 jam, rata-rata 16 jam
	Anak-Anak	4,6 jam; anak-anak (>10 tahun) memiliki waktu paruh lebih lama (>5 jam) dibandingkan dengan anak-anak 5-10 tahun (<5 jam).
	Dewasa	Individu dengan fungsi ginjal normal 6-9 jam; pasien ginjal stadium akhir 15-35 jam.
8.	Ekskresi	Fekal (50%) dan urin (40% dalam bentuk obat tidak berubah).

(*American Pharmacist Association, 2009*)

3. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduсібel, dan sesuai pada *range* analit yang akan dianalisis.

a. Spesifisitas

Spesifitas adalah kemampuan mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. *International Conference of Harmonization* (ICH) membagi spesifisitas dalam dua kategori, yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran.

Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadar, spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah dua senyawa yang berdekatan (sebagaimana dalam kromatografi). Senyawa-senyawa tersebut biasanya adalah komponen utama atau komponen aktif dan atau suatu pengotor. Jika dalam suatu uji terdapat suatu pengotor (*impurities*) maka metode uji harus tidak terpengaruh dengan adanya pengotor ini. Penentuan spesifisitas dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu yang pertama adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain dan cara kedua adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama (Gandjar dan Rohman, 2013).

b. Linearitas

Linearitas merupakan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang ditentukan. Linearitas suatu metode merupakan ukuran kualitas kurva kalibrasi yang menghubungkan antar respon dengan konsentrasi. Linearitas dapat ditunjukkan dari nilai koefisien korelasi (r) dan linearitas yang ideal adalah jika nilai $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis (Harmita, 2004).

c. Keseksamaan (*Presicion*)

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 RSD.

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 analisis yang berbeda pula. Analisis 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 analisis yang berbeda. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16%, dan pada kadar *part per bilion* (ppb) adalah 32%. (Harmita, 2004).

d. Batas deteksi (*limit of detection*, LOD) dan batas kuantifikasi (*limit of quantification*, LOQ)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu.

Penentuan LOD pada kromatografi lapis tipis menurut ICH cukup menggunakan visual atau non instrumental, namun cara tersebut kurang akurat sehingga LOD juga dapat dihitung berdasarkan nilai standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*, S) kurva baku pada level mendekati LOD sesuai dengan rumus,

$$\text{LOD} = 3,3 \left(\frac{SD}{S} \right)$$

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan). LOQ dihitung dengan persamaan:

$$\text{LOQ} = 10 \left(\frac{SD}{S} \right)$$

S adalah respon dari kemiringan (slope) kurva baku dan SD adalah standar deviasi (Gandjar dan Rohman, 2013).

e. 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. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur.

Kecermatan dalam penelitian ini menggunakan metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan dengan konsentrasi rendah, sedang dan tinggi ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi serta direplikasi masing-masing konsentrasi sebanyak tiga kali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen 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.

Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan.

Kriteria kecermatan sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode (RSD). Selisih kadar pada berbagai penentuan (X_d) harus 5% atau kurang pada setiap konsentrasi analit pada mana prosedur dilakukan. Harga rata-rata selisih secara statistik harus 1,5% atau kurang. Kriteria tersebut dinyatakan secara matematik sebagai berikut:

$$\left\{ \frac{X_d}{X_0} \times 100 \right\} < 5\% \quad \left\{ \frac{X_d}{X_0} \times 100 \right\} - \frac{(S(0,95 \ n-1))}{n} < 1,5\% \quad X_d = X_i - X_0$$

X_i = hasil analisis

X_0 = hasil yang sebenarnya

I = nilai t pada tabel t' *student* pada atas 95%

S = simpangan baku relatif dari semua pengujian

n = jumlah sampel yang dianalisis

Kadar analit dalam metode penambahan baku dapat dihitung sebagai berikut:

$$\frac{C}{C+S} = \frac{R_1}{R_2} \quad C = S \left[\frac{R_1}{R_2 - R_1} \right]$$

C = kadar analit dalam sampel

S = kadar analit yang ditambahkan pada sampel

R_1 = respon yang diberikan sampel

R_2 = respon yang diberikan campuran sampel dengan tambahan analit

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{C_f - C_a}{C_{aa}} \times 100$$

C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C_{AA} = konsentrasi analit yang ditambahkan

Perhitungan persen perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sederhana seperti di bawah ini:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{\text{hasil pengukuran } (\mu\text{g})}{\text{bahan rujukan standar } (\mu\text{g})} \times 100 \%$$

Pada metode penambahan baku, pengukuran blanko tidak diperlukan lagi. Metode ini tidak dapat digunakan jika penambahan

analit dapat mengganggu pengukuran, misalnya analit yang ditambahkan menyebabkan kekurangan pereaksi, mengubah pH atau kapasitas dapar, dan lainnya (Harmita, 2004).

