

## SENYAWA PENGKUPLING $\alpha$ -NAFTHILAMIN UNTUK VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI PENENTUAN NITRIT ( $\text{NO}_2^-$ ) DI DALAM AIR

Maruni Wiwin Diarti, I Gusti Ayu Nyoman Danuyanti, I Gede Billy Sumantri

**Abstract:** Validation of analytical methods need to be conducted to determine the feasibility of the method when the method is newly developed or modified. Determination of nitrite in water-based Cupling diazotized reaction has been developed in various fields. Many modifications have been carried out primarily in the selection of the source of the diazonium salt compound or compounds that can cupling. The this study was to determine the validity of the determination of nitrite in water by spectrophotometric method cupling compound  $\alpha$ -nafthilamin. This study is a pre-experiments with experimental units and large units based guidelines experimental validation of analytical methods. The results show the value of 0.995 linearity, limit of detection (LOD) 0.039 ppm, 0.882 sensitivity, precision 1.38%, and 100.37% accuracy rate. The conclusion of this study is the method of spectrophotometric determination of nitrite in water using compound  $\alpha$ -nafthilamin cupling valid for determining the concentration of nitrite in the water with a minimum detection limit of 0.039 ppm.

**Kata Kunci :** Validation method, Determination of nitrite,  $\alpha$ -nafthilamin.

### PENDAHULUAN

Reaksi diazotasi adalah reaksi antara nitrit dengan senyawa yang memiliki amin aromatik primer dalam suasana asam akan membentuk garam diazonium. Beberapa senyawa yang memiliki amin aromatik primer yang umum digunakan sebagai sumber garam diazonium adalah Anilin, Asam sulfanilat, atau  $p$ -nitro anilin (Fessenden, 1991). Garam diazonium dapat bereaksi dengan senyawa lain yang memiliki gugus fenil terbuka, disebut sebagai senyawa pengkupling, akan menghasilkan senyawa azo. Kombinasi garam diazonium dengan senyawa pengkupling yang berbeda-beda menghasilkan senyawa azo dengan karakteristik yang berbeda-beda, misalnya, senyawa pengkupling  $\beta$ -naftol dengan sumber garam diazonium 3-nitroanilin akan membentuk senyawa azo berwarna merah, senyawa pengkupling *N*-(1-naphthyl) ethylene

*diamine dihydrochloride* dengan sumber garam diazonium asam sulfanilat akan membentuk senyawa azo berwarna merah keunguan, senyawa pengkupling fenol dengan sumber garam diazonium anilin akan membentuk senyawa azo berwarna orange (Fessenden, 1991). Berbagai metode baik dalam bidang farmasi, kimia, bahkan bakteriologi telah dikembangkan berdasarkan pada reaksi diazotasi-kupling diantaranya mendeteksi nitrit sebagai reduksi nitrat oleh bakteri, penetapan kadar Furosamide, penetapan kadar nitrit dalam air, dan lain-lain (Metwally dan Belal, 1992; Shah, 2005). Senyawa  $\alpha$ -nafthilamin pertama kali digunakan oleh Peter Griess pada tahun 1879 sebagai senyawa pengkupling dengan sumber garam diazonium Asam sulfanilat untuk mendeteksi adanya nitrit dalam suatu larutan atau campuran. Senyawa azo yang terbentuk memiliki karakteristik berwarna merah keunguan.

Saat ini  $\alpha$ -naphthylamine umumnya digunakan dalam bidang bakteriologi untuk mendeteksi adanya nitrit sebagai reduksi nitrat oleh bakteri. Di Indonesia sesuai ketetapan Badan Standarisasi Nasional penetapan kadar nitrit dalam air menggunakan Sulfanilamid sebagai sumber garam diazonium dan *N*-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride sebagai senyawa pengkupling (Badan Standarisasi Nasional, 2004; Buxton, 2012). Berdasarkan penelitian pendahuluan menggunakan  $\alpha$ -naphthylamine sebagai senyawa pengkupling dengan sumber garam diazonium Asam sulfanilat dapat membentuk senyawa azo dengan karakteristik warna yang hampir sama dengan senyawa azo yang terbentuk dengan senyawa pengkupling *N*-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride dengan sumber garam diazonium sulfanilamid. Oleh karena itu, dalam penelitian ini peneliti ingin mencoba menggunakan senyawa  $\alpha$ -naphthylamine sebagai senyawa pengkupling pada penentuan nitrit dalam air metode spektrofotometri. Metode yang dimodifikasi tersebut akan diuji validitasnya dengan menentukan parameter validasi metode analisis. Hasil pengujian tersebut akan menentukan apakah metode yang dimodifikasi tersebut layak atau tidak digunakan untuk menentukan konsentrasi nitrit di dalam air secara spektrofotometri.

## METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini merupakan penelitian *pre-experiment*. Penelitian *pre-experiment* memenuhi 2 dari 3 syarat *true-experiment* yaitu replikasi dan kontrol sedangkan randomisasi tidak terpenuhi (Notoatmodjo, 2005). Unit eksperimen dalam

penelitian ini menggunakan larutan standar nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) dengan kadar 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,3 ppm, 0,4 ppm, dan 0,5 ppm dan sampel dengan konsentrasi nitrit 0,1 ppm, 0,3 ppm, dan 0,5 ppm. Standar dan Sampel dibuat dari natrium nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) yang dilarutkan dengan akubidest yang telah diuji kemampuan menghantar listriknya hampir nol untuk meminimalkan adanya pengganggu. Penentuan linearitas, batas deteksi (LoD), sensitifitas dan presisi dalam pedoman validasi metode analisis menggunakan satu seri larutan standar yang berbeda konsentrasinya untuk menentukan presisi pembacaan minimal direplikasi sebanyak 6 kali sehingga dalam penelitian ini menggunakan 5 larutan standar sebagai unit eksperimen dengan konsentrasi 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,3 ppm; 0,4 ppm; dan 0,5 ppm masing-masing direplikasi sebanyak 6 kali. Jadi dalam penentuan linearitas, batas deteksi (LoD), sensitifitas, dan presisi menggunakan 30 unit eksperimen (Harmita, 2004). Penentuan akurasi menggunakan suatu sampel dengan konsentrasi yang telah diketahui, dalam pedoman validasi tidak dijelaskan berapa minimal unit eksperimen yang harus digunakan tapi dalam penelitian ini digunakan konsentrasi sampel dengan konsentrasi 0,1 ppm; 0,3 ppm; dan 0,5 ppm dengan pembacaan masing-masing diulang sebanyak 5 kali. Instrumentasi penelitian : Spektrofotometer, Neraca analitik, Labu Ukur 1000 ml, 500 ml, dan 50 ml, *Becker glass* 1000 ml, 500 ml, dan 200 ml, Labu erlenmeyer 100 ml, Pipet volume 1 ml, 2ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, dan 50 ml, Pipet ukur 1 ml, Pipet tetes. Reagensia semua reagensia yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dari bahan kimia dengan derajat kemurnian *pro analis*

(pa), Larutan induk nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) dengan konsentrasi 250 ppm, Larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) dengan konsentrasi 50 ppm, Larutan standar nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) konsentrasi 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,3 ppm; 0,4 ppm; dan 0,5 ppm, Larutan pereaksi sulfanilamid 1% b/v, Larutan pereaksi  $\alpha$ -naphthylamine 0,6 % b/v dalam etanol.

#### Metoder kerja :

a. Pembuatan larutan induk nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) 250 ppm sebanyak 1000 ml

- 1) Dipastikan alat-alat yang akan digunakan telah bersih dan dikalibrasi
- 2) Dibilas alat-alat gelas yang akan digunakan dengan aquabidest
- 3) Ditimbang Natrium nitrit 1,232 gram
- 4) Dimasukkan dalam *becker glass*
- 5) Ditambahkan aquabidest sedikit demi sedikit hingga larut
- 6) Dipindahkan dalam labu ukur 1000 ml
- 7) Ditepatkan sampai tanda dengan pipet tetes

b. Pembuatan larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) 50 ppm sebanyak 50 ml

- 1) Dipastikan alat-alat yang akan digunakan telah bersih dan dikalibrasi
- 2) Dibilas alat-alat gelas yang akan digunakan dengan aquabidest
- 3) Dipipet dengan pipet volume 10,0 ml larutan induk nitrit.
- 4) Dimasukkan dalam labu ukur 50 ml
- 5) Ditambahkan aquabidest sedikit demi sedikit sambil dikocok
- 6) Ditepatkan sampai tanda dengan pipet tetes.

(Tujuan pembuatan larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) 50 ppm adalah untuk memperbesar

nilai pemipetan dalam pembuatan larutan standar nitrit sehingga mengurangi faktor kesalahan)

c. Pembuatan larutan standar nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,3 ppm; 0,4 ppm; dan 0,5 ppm masing-masing sebanyak 500 ml

- 1) Dipastikan alat-alat yang akan digunakan telah bersih dan dikalibrasi
- 2) Dibilas alat-alat gelas yang akan digunakan dengan aquabidest
- 3) Dipipet dengan pipet volume masing-masing:
  - a) 1,0 ml larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) untuk pembuatan larutan standard 0,1 ppm
  - b) 2,0 ml larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) untuk pembuatan larutan standard 0,2 ppm
  - c) 3,0 ml larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) untuk pembuatan larutan standard 0,3 ppm
  - d) 4,0 ml larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) untuk pembuatan larutan standard 0,4 ppm
  - e) 5,0 ml larutan intermediet nitrit ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) untuk pembuatan larutan standard 0,5 ppm

4) Dimasukkan dalam labu ukur 500 ml

5) Ditambahkan aquabidest sedikit demi sedikit sambil dikocok

6) Ditepatkan sampai tanda dengan pipet tetes.

d. Pembuatan larutan pereaksi sulfanilamid 1% b/v

- 1) Dipastikan alat-alat gelas yang akan digunakan dalam keadaan bersih

- 2) Dibilas alat-alat gelas yang akan digunakan dengan aquabidest
  - 3) Ditimbang 1 gram Sulfanilamid
  - 4) Dimasukkan dalam *becker glass* yang telah disiapkan
  - 5) Ditambahkan 20 ml aquabidest
  - 6) Ditambahkan 10 ml HCl pekat
  - 7) Diaduk sampai sulfanilamid larut, bila sudah larut ditambahkan aquabidest sampai 100 ml.
  - 8) Dipindahkan dalam botol yang telah disiapkan.
- e. Pembuatan larutan pereaksi  $\alpha$ -nafthilamin 0,6% b/v dalam etanol 95%.
- 1) Dipastikan alat-alat gelas yang akan digunakan dalam keadaan bersih
  - 2) Dibilas alat-alat gelas yang akan digunakan dengan aquabidest
  - 3) Ditimbang 600 mg  $\alpha$ -nafthilamin
  - 4) Dimasukkan dalam *becker glass*
  - 5) Ditambahkan etanol 95% sedikit demi sedikit hingga larut
  - 6) Ditambahkan etanol 95% sampai 100 ml
  - 7) Dipindahkan dalam botol gelap yang telah disiapkan.
- f. Pengukuran absorbansi larutan standar nitrit
- 1) Dipastikan alat-alat gelas yang akan digunakan telah bersih dan telah dibilas dengan aquabidest.
  - 2) Dioptimalkan spektrofotometer sesuai petunjuk penggunaan alat.
  - 3) Dipipet 50,0 ml larutan standar yang akan diukur absorbansinya, dimasukkan dalam labu erlenmeyer yang telah disiapkan.
- 4) Ditambahkan 1 ml larutan sulfanilamid, dikocok, dan didiamkan 2-8 menit.
  - 5) Ditambahkan 1 ml larutan  $\alpha$ -nafthilamin, dikocok dan didiamkan selama 15 menit dan segera lakukan pengukuran absorbansi (pengukuran tidak boleh dilakukan lebih dari 1 jam).
  - 6) Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 543 nm.
  - 7) Dilakukan replikasi masing-masing 6 kali.
- g. Menentukan konsentrasi sampel nitrit untuk menentukan *persen recovery*.
- 1) Dipastikan alat-alat gelas yang digunakan telah bersih dan telah dibilas dengan aquabidest.
  - 2) Dioptimalkan spektrofotometer sesuai petunjuk penggunaan alat.
  - 3) Dipipet 50,0 ml sampel yang akan diukur konsentrasinya, dimasukkan dalam labu erlenmeyer yang telah disiapkan.
  - 4) Ditambahkan 1 ml larutan Sulfanilamid, dikocok, dan didiamkan 2-8 menit.
  - 5) Ditambahkan 1 ml larutan  $\alpha$ -nafthilamin, dikocok, didiamkan selama 15 menit, dan segera lakukan pengukuran absorbansi (pembacaan jangan ditunda lebih dari 1 jam)
  - 6) Ditentukan konsentrasi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 543 nm.
  - 7) Perlakuan direplikasi 5 kali.  
(Penentuan pembacaan setelah 15 menit penambahan  $\alpha$ -nafthilamin dan penundaan tidak lebih 1 jam didasarkan atas percobaan

sederhana pengukuran absorbansi dengan interval waktu dimana dalam waktu 15 menit sampai 1 jam tidak terjadi perubahan absorbansi)

Data yang didapat dipergunakan untuk menentukan nilai parameter validasi sebagai berikut:

a. Penentuan linearitas

Linearitas diperoleh dari pembuatan kurva standar antara konsentrasi terhadap absorbansi. Dimana yang digunakan sebagai sumbu x adalah konsentrasi larutan standar dan yang digunakan sebagai sumbu y adalah absorbansi. Dari kurva tersebut dicari persamaan regresinya, sehingga diperoleh persamaan berikut:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

$$b = \text{Slope}$$

$$a = \text{Intercept}$$

$$y = \text{Nilai absorban pada sumbu y}$$

$$x = \text{Kadar larutan standar pada sumbu x}$$

Berdasarkan kurva tersebut didapatkan nilai koefisien korelasi (r).

b. Penentuan batas deteksi (LoD)

Untuk menentukan nilai LoD pertama-tama kita harus menghitung nilai absorbansi hitung ( $\hat{y}$ ) yang didapat dari substitusi nilai x pada persamaan regresi garis linear  $y = bx + a$ . Selanjutnya dicari nilai  $S_b$  (Simpangan baku terhadap blanko) dengan persamaan:

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$$

Keterangan:

$$S_b = \text{Simpangan baku terhadap blanko}$$

$\hat{y}$  = nilai absorbansi hitung, yaitu nilai y yang didapat dengan substitusi masing-masing nilai x ke dalam persamaan garis linear  $y = bx + a$

$y_i$  = nilai absorban pengukuran, yaitu nilai y masing-masing konsentrasi (x).

n = jumlah standar nitrit yang digunakan.

Dicari nilai LoD dengan persamaan:

$$\text{LoD} = \frac{3 \cdot x \cdot S_b}{b}$$

Keterangan:

LoD = Batas Deteksi

b = nilai slope (b) pada persamaan regresi garis lineary =  $bx + a$ .

c. Penentuan sensitifitas

Sensitifitas ditentukan dari harga slope (b) yang berasal dari regresi linier kurva standar  $y = bx + a$ .

d. Penentuan presisi

Berdasarkan data diatas dapat dicari nilai standar deviasi (SD) dengan cara:

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Keterangan: n = jumlah replikasi

Selanjutnya presisi dihitung sebagai simpangan baku relative (RSD) atau koefisien variasi (KV), ditentukan dengan cara:

$$\text{KV} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100\%$$

e. Penentuan Akurasi

Untuk menentukan nilai akurasi metode yang dinyatakan sebagai *persen recovery* ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Kadar pembacaan} \times 100\%}{\text{kadar sebenarnya}}$$

## HASIL PENELITIAN

### 1. Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Nitrit

**Tabel 1. Hasil Pembacaan Absorbansi Standar Nitrit**

No	Konst. (ppm)	Absorbansi						$\bar{x}$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	
1	0,1	0,106	0,103	0,105	0,104	0,107	0,103	0,105
2	0,2	0,176	0,173	0,175	0,179	0,180	0,177	0,177
3	0,3	0,255	0,257	0,259	0,264	0,264	0,260	0,260
4	0,4	0,372	0,372	0,362	0,372	0,375	0,371	0,371
5	0,5	0,444	0,447	0,446	0,445	0,459	0,450	0,449

Hasil pembacaan konsentrasi sampel nitrit yang digunakan untuk menentukan akurasi dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Pembacaan Konsentrasi Sampel Nitrit**

No	Sampel (ppm)	Konsentrasi (ppm)					Rata-rata (ppm)
		1	2	3	4	5	
1	0,1	0,103	0,101	0,103	0,096	0,102	0,1010
2	0,3	0,300	0,298	0,303	0,298	0,299	0,2996
3	0,5	0,502	0,500	0,499	0,506	0,500	0,5010

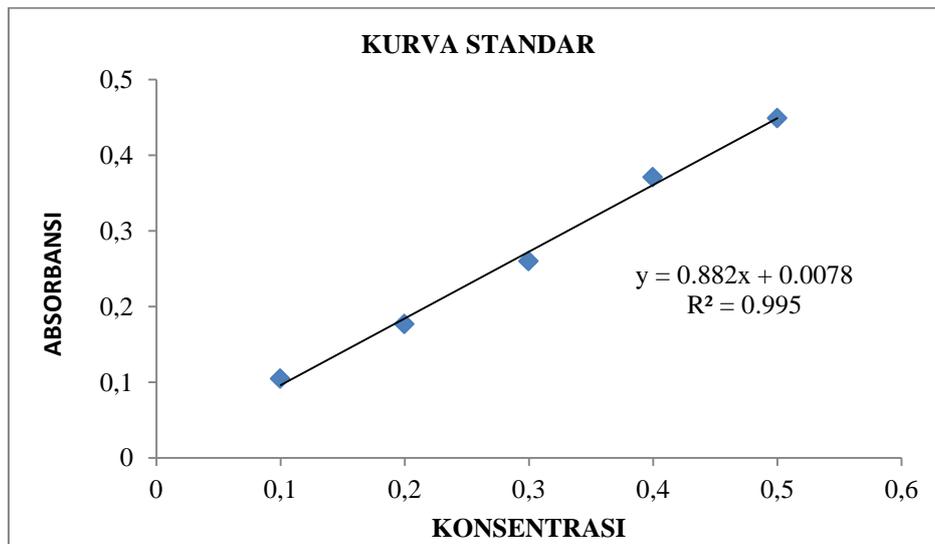
Berdasarkan data tersebut dapat ditentukan nilai linearitas metode, batas deteksi metode (LoD), Sensitifitas metode, presisi dan akurasi metode.

#### 1. Penentuan Linearitas Metode

Linearitas metode ditentukan dengan membaca absorbansi larutan standar dengan berbagai variasi konsentrasi. Berdasarkan hasil pembacaan tersebut dibuat kurva kalibrasi

dengan sumbu x adalah konsentrasi dan sumbu y adalah absorbansi. Dari kurva tersebut dapat ditentukan nilai koefisien korelasi yang merupakan acuan linearitas.

Absorbansi rata-rata larutan standar seperti yang ditunjukkan pada tabel 4.1. kemudian dibuat kurva standar sebagai berikut:



**Gambar 1. Kurva Standar**

Pada gambar 1. dapat dilihat nilai koefisien korelasi (r) yang didapat adalah 0,995.

**2. Penentuan Batas Deteksi (LoD)**

Untuk menentukan nilai batas deteksi (LoD) pertama-tama kita harus menghitung nilai absorbansi hitung ( $\hat{y}$ ) yang didapat dari substitusi

nilai x pada persamaan regresi garis linear  $y = bx + a$ . Berdasarkan kurva standar pada gambar 1 didapat persamaan regresi linear  $y = 0,882x + 0,0078$ . Data hasil penghitungan nilai absorbansi hitung ( $\hat{y}$ ) dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Data Hasil Penghitungan Absorbansi Hitung ( $\hat{y}$ )**

No	Konsentrasi (x) dalam ppm	Perhitungan	Absorbansi hitung ( $\hat{y}$ )
1	0,1	$0,882 \times 0,1 + 0,0078$	0,096
2	0,2	$0,882 \times 0,2 + 0,0078$	0,1842
3	0,3	$0,882 \times 0,3 + 0,0078$	0,2724
4	0,4	$0,882 \times 0,4 + 0,0078$	0,3606
5	0,5	$0,882 \times 0,5 + 0,0078$	0,4488

Selanjutnya dicari nilai simpangan baku terhadap blangko dengan rumus  $S_b = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$ , nilai  $\sum(y_i - \hat{y})^2$  dapat dilihat pada tabel 3 Nilai

$y_i$  merupakan nilai absorbansi pengukuran konsentrasi standar nitrit sesuai tabel 4.

**Tabel 4. Data Hasil Perhitungan Nilai  $\sum(y_i - \hat{y})^2$**

No	Konsentrasi standar	Absorbansi ukur ( $y_i$ )	Absorbansi hitung ( $\hat{y}$ )	$(y_i - \hat{y})^2$
1	0,1	0,105	0,096	0,000081
2	0,2	0,177	0,1842	0,00005184
3	0,3	0,260	0,2724	0,00015376
4	0,4	0,371	0,3606	0,00010816
5	0,5	0,449	0,4488	0,00000004
$\sum(y_i - \hat{y})^2$				0,0003948

Perhitungan nilai simpangan baku terhadap blangko ( $S_b$ ) adalah sebagai berikut:

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{0,0003948}{5-2}}$$

$$S_b = \sqrt{0,0001316}$$

$$S_b = 0,011471704$$

Perhitungan nilai batas deteksi (LoD) adalah sebagai berikut:

$$LoD = \frac{3 \times S_b}{b}$$

$$LoD = \frac{3 \times 0,011471704}{0,882}$$

$$LoD = 0,039$$

Berdasarkan perhitungan didapatkan nilai batas deteksi (LoD) adalah 0,039 ppm.

**Tabel 5. Tabel Penghitungan Presisi**

No	standar	$\sum(x_i - \bar{x})^2$	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)
1	0,1	0,000014	0,00167332	1,59
2	0,2	0,000034	0,002607681	1,47
3	0,3	0,000067	0,003660601	1,41
4	0,4	0,0001	0,004472136	1,20
5	0,5	0,000155	0,005567764	1,24
<b>Rerata</b>				1,38

Berdasarkan penghitungan presisi pada tabel 6 didapatkan nilai presisi yang dinyatakan sebagai nilai koefisien variasi adalah 1,38 %.

**5. Penentuan Akurasi**

**3. Penentuan Nilai Sensitifitas**

Sensitifitas ditentukan dari nilai *slope* (b) pada persamaan regresi garis linear  $y = bx + a$ . Berdasarkan kurva standar yang terlihat pada gambar 4.1 didapatkan persamaan regresi garis linear adalah  $y = 0,882x + 0,0078$ . Jadi nilai sensitifitas adalah 0,882.

**4. Penentuan Presisi**

Data hasil penentuan presisi diperoleh dari pengukuran absorbansi larutan standar. Sesuai dengan data yang ditunjukkan pada tabel 5 dapat dihitung nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (KV). Tabel hasil penghitungan presisi dapat dilihat pada tabel 5.

Untuk menentukan akurasi dilakukan pengukuran sampel dengan metode yang divalidasi dimana konsentrasi sampel yang sebenarnya telah diketahui. Akurasi dinyatakan sebagai *persen recovery* yang didapat dengan rumus:

$$\text{Persen recovery} = \frac{\text{Konsentrasi pembacaan}}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

Data hasil perhitungan *persen recovery* dapat dilihat pada tabel 6

**Tabel 6. Data Hasil Perhitungan *Persen Recovery***

No	Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Konsentrasi pembacaan (ppm)	% recovery
1	0,1	0,1010	101,0
2	0,3	0,2996	99,9
3	0,5	0,5010	100,2
<b>Rerata (%)</b>			100,37

Berdasarkan penghitungan nilai akurasi pada tabel 6 didapatkan nilai akurasi yang dinyatakan sebagai *persen recovery* sebesar 100,37%.

## PEMBAHASAN

Validasi metode analisis adalah adalah suatu tindakan penilaian terhadap suatu metode, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk memastikan atau mengkonfirmasi bahwa metode tersebut sesuai untuk penggunaannya. Penentuan berbagai parameter validasi metode analisis perlu dilakukan untuk metode yang baru dikembangkan atau metode yang dimodifikasi untuk mengetahui kelayakannya. Dalam penelitian ini parameter validasi yang ditentukan adalah linearitas, batas deteksi, sensitifitas, presisi, dan akurasi. Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi pada konsentrasi standar nitrit (NO<sub>2</sub>-N) 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,3 ppm; 0,4 ppm; dan 0,5 ppm didapatkan kurva standar dengan *koefisien korelasi* atau linearitas 0,995. Nilai ini telah sesuai dengan standar baku SNI 06-6989.9-2004 cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah untuk pengendalian mutu dimana linearitas tidak boleh lebih rendah dari 0,99. Tercapainya nilai linearitas diatas 0,99 menandakan bahwa walaupun dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -

naftilamin metode tersebut tetap mampu memberikan respon proporsional terhadap berbagai perubahan konsentrasi nitrit dalam sampel. Batas deteksi (LoD) untuk metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -naftilamin berdasarkan hasil perhitungan didapatkan nilai 0,039 ppm. Nilai ini mengindikasikan bahwa batas minimal nitrit dalam sampel yang dapat diperiksa dengan metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -naftilamin dan masih memberikan respon signifikan dan memenuhi kriteria teliti atau seksama adalah 0,039 ppm. Dibandingkan dengan metode baku menurut SNI 06-6989.9-2004 tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah, metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -naftilamin mengalami penurunan kemampuan deteksi dimana dalam SNI tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah kisaran konsentrasi nitrit minimal yang diharapkan dapat ditentukan adalah 0,01 ppm. Nilai sensitifitas metode yang didapatkan dari metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -naftilamin adalah 0,882. Nilai ini mengindikasikan bahwa setiap peningkatan 1 ppm nitrit dalam sampel terjadi peningkatan absorbansi sekitar 0,882. Semakin tinggi nilai sensitifitas mengindikasikan semakin pekanya suatu metode.

Dalam pedoman baku SNI tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah tidak terdapat penjelasan tentang sensitifitas metode yang harus dipenuhi. Nilai presisi dinyatakan dengan nilai Koefisien variasi. Nilai presisi atau koefisien variasi yang didapatkan dari metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin adalah 1,38%. Presisi adalah ukuran yang menunjukkan besarnya kesesuaian atau perbedaan hasil pengukuran sampel yang sama dan dilakukan berulang-ulang. Presisi dapat dikatakan sebagai ukuran ketelitian suatu metode. Dalam SNI 06-6989.9-2004 tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah untuk mengendalikan mutu pemeriksaan, perbedaan hasil analisis yang dilakukan berulang tidak boleh lebih besar dari 5%. Berdasarkan petunjuk pelaksanaan validasi metode yang dijelaskan oleh Harmita (2004) dikatakan bahwa kriteria seksama atau teliti diberikan jika metode memberikan nilai koefisien variasi 2% atau kurang akan tetapi persyaratan ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Nilai maksimal koefisien variasi atau presisi untuk pengukuran konsentrasi dalam satuan satu per sejuta (ppm) adalah 16%. Dengan nilai presisi atau koefisien variasi 1,38% maka metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin telah memenuhi standar baik menurut SNI 06-6989.9-2004 maupun menurut pedoman validasi metode. Nilai akurasi metode adalah nilai yang menunjukkan kedekatan hasil analisis dengan konsentrasi sebenarnya dari sampel yang diperiksa. Nilai akurasi dinyatakan sebagai

*persen recovery*. Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan didapatkan nilai *persen recovery* dari metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin adalah 100,37%. Menurut pedoman baku penentuan kadar nitrit dalam SNI 06-6989.9-2004 tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah sebagai kontrol akurasi nilai *persen recovery* harus berada pada kisaran 90% sampai dengan 110% dengan kata lain  $100\% \pm 10\%$ . Menurut Harmita dalam petunjuk pelaksanaan validasi metode (2004) *persen recovery* yang diperbolehkan adalah  $100\% \pm 5\%$ . Dengan nilai *persen recovery* 100,37% yang sama artinya dengan  $100\% + 0,37\%$  maka metode yang dimodifikasi ini telah memenuhi standar baik menurut SNI maupun menurut pedoman validasi metode. Berdasarkan nilai berbagai parameter validasi tersebut metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin telah memenuhi ketentuan dari Badan Standarisasi Nasional sesuai dengan SNI 06-6989.9-2004 tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah dalam hal jaminan mutu, pengendalian mutu, dan kontrol ketelitian. Hal tersebut membuktikan metode penentuan nitrit yang dimodifikasi dengan menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin valid digunakan untuk menentukan konsentrasi nitrit dalam air sepanjang konsentrasi minimal nitrit dalam sampel tidak dibawah 0,039 ppm. Kelemahan dari metode yang dimodifikasi menggunakan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin jika ditinjau dari ketentuan Badan Standarisasi Nasional sesuai SNI 06-6989.9-2004 tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah adalah nilai batas deteksi (LoD)

yang berada diatas 0,01 ppm. Hal ini dapat disebabkan oleh berbagai hal yang memerlukan penelitian lebih lanjut yang berkaitan dengan optimalisasi pembacaan absorbansi dan pembentukan warna. Hal-hal yang mungkin dapat diteliti lebih lanjut untuk meningkatkan kemampuan batas deteksi metode ini adalah panjang gelombang maksimum, suasana pH reaksi, dan konsentrasi optimal dari  $\alpha$ -nafthilamin. Panjang gelombang maksimum pembacaan absorbansi dapat meningkatkan nilai absorbansi yang didapatkan. Walaupun warna yang terbentuk hampir sama dengan warna yang terbentuk dengan menggunakan metode baku namun tetap perlu dilakukan pengujian untuk menentukan panjang gelombang maksimum sehingga bisa didapatkan nilai absorbansi pembacaan tertinggi. Peningkatan nilai absorbansi pengukuran dapat memperkecil selisih antara absorbansi ukur ( $\square_{\square}$ ) dan absorbansi hitung ( $\acute{y}$ ). Nilai selisih yang semakin kecil akan menurunkan hasil penghitungan penentuan batas deteksi menjadi lebih rendah. Suasana pH kemungkinan dapat mempengaruhi kualitas garam diazonium yang terbentuk dalam reaksi diazotasi, dimana kualitas garam diazonium ini akan mempengaruhi kualitas warna yang terbentuk, ideal yang diharapkan adalah terbentuknya warna maksimal dengan konsentrasi nitrit minimal. Kualitas warna yang lebih bagus akan meningkatkan nilai absorbansi yang kemungkinan dapat menurunkan nilai batas deteksi setelah penghitungan. Konsentrasi optimal  $\alpha$ -nafthilamin kemungkinan berpengaruh pada nilai blangko, untuk mengurangi terbentuknya warna yang tidak perlu dan tidak diinginkan perlu diadakan penelitian konsentrasi

optimal senyawa pengkupling untuk meminimalkan terbentuknya warna pengganggu akibat adanya sisa senyawa pengkupling yang berlebih. Pengurangan nilai blangko dapat meningkatkan nilai absorbansi pembacaan yang kemungkinan dapat menurunkan nilai hasil penghitungan batas deteksi (LoD). Hal lain yang penting untuk diteliti adalah pengaruh suhu terhadap reaksi diazotasi. Menurut beberapa ahli garam diazonium yang terbentuk dalam reaksi diazotasi tidak stabil pada suhu diatas 15°C, tapi menurut beberapa jurnal penelitian yang berkaitan dengan penerapan reaksi diazotasi-kupling tergantung dari sumber garam diazonium dan senyawa pengkupling yang digunakan, reaksi diazotasi-kupling ada yang bereaksi optimal pada suhu kamar dan ada juga yang optimal pada suhu di bawah 15°C. Penelitian terhadap pengaruh suhu ini kemungkinan akan dapat mempercepat laju reaksi sehingga waktu penentuan nitrit dapat lebih cepat (Metwally dan Belal, 1992; Shah, 2005; Deb, 2007; Khan, 2007; Narayana, 2009; Fessenden, 1991).

## KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Nilai linearitas metode spektrofotometri penentuan nitrit dalam air dengan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin adalah 0,995. Nilai ini dapat memenuhi standar dari Badan Standarisasi Nasional yang mensyaratkan nilai linearitas minimal 0,99.
2. Batas deteksi metode spektrofotometri penentuan nitrit dalam air dengan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin adalah 0,039 ppm. Nilai ini berada diluar batas deteksi yang

disarankan oleh Badan Standarisasi Nasional dalam SNI 06.6989-9.2004 yaitu 0,01 ppm.

3. Nilai sensitifitas metode spektrofotometri penentuan nitrit dalam air dengan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin adalah 0,882.
4. Nilai Presisi metode spektrofotometri penentuan nitrit dalam air dengan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin adalah 1,38%. Nilai ini memenuhi Standar Nasional Indonesia tentang cara uji nitrit secara spektrofotometri dalam air dan air limbah yang mensyaratkan nilai presisi tidak boleh lebih dari 5%.
5. Akurasi metode spektrofotometri penentuan nitrit dalam air dengan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin dinyatakan dengan nilai *persen recovery* 100,37%. Nilai ini sesuai dengan Standar Nasional Indonesia 06.6989-9.2004 yang mensyaratkan nilai *persen recovery* harus berkisar antara 90%-110%.
6. Penentuan kadar nitrit dalam air metode spektrofotometri dengan senyawa pengkupling  $\alpha$ -nafthilamin valid untuk menentukan konsentrasi nitrit dalam air dengan batas deteksi minimal 0,039 ppm.

#### Saran

Berdasarkan penelitian ini dapat disarankan:

1. Penggunaan  $\alpha$ -nafthilamin sebagai senyawa pengkupling alternatif dalam menentukan konsentrasi nitrit dalam air metode spektrofotometri dengan perkiraan konsentrasi minimal nitrit dalam sampel tidak kurang dari 0,039 ppm.
2. Penelitian lebih lanjut untuk menentukan panjang gelombang maksimum pembacaan,

suasana pH optimal reaksi, konsentrasi optimal  $\alpha$ -nafthilamin yang dapat digunakan, dan suhu optimal reaksi diazotasi-kupling

#### DAFTAR PUSTAKA

- Badan Standarisasi Nasional, 2004, *SNI 06-6989.9-2004, Air dan Air Limbah – bagian 9 : Cara Uji Nitrit (NO<sub>2</sub>-N) secara Spektrofotometri*, Jakarta.
- Basset, J., Denny, R. C., Jeffrey, G. H., Mendham, J., 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik* Edisi ke-4. Jakarta : EGC
- Buxton, R, 2012, *Nitrate and Nitrate Reduction Test Protocol*, American Society for Microbiology, <http://www.microbelibrary.org>
- Deb, M. K., Thakur, M., Khande, P., 2007, Determination of Nitrite, Nitrate and Total Nitrogen Ni Vegetable Sampel. Bull. Chem. Soc. Ethiop., 21(3), 445-450, School of Studies Ni Chemistry, Pt. Ravisankar Shukla University Rajpur, India
- Fessenden, R. J., Fessenden J. S., 1991, *Kimia Organik, Edisi Ketiga, Jilid 1*, Alih Bahasa Aloysius Hadyana Pudjaatmaka PhD, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Fluke Analytical, 2010, *Nitrate Reagent A (1-Naphthylamine Solution) and B (Sulfanilic Acid Solution)*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Industriase, Switzerland
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan validasi Metode dan Cara perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. 1, No. 3, Desember 2004, 117-135, ISSN:1693-9883*, Departemen Farmasi FMIPA-UI
- Khan, M. A., Karim, M. M., Wabaidur, S. M., 2007, Spectrophotometric Methode for The Detremination of Nimesulide in Bulk and Various Dosage Form, *Applied Chemistry Vol. 11 No. 2, November, 453-456*, Department of Chemistry, Kyungpook

- National University, Taegu, 702-701, Korea.
- Khopkar SM., 2003, *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kurniawan, D., Regresi Linear (Linear Regresssion), 2008, *R Development Core Team (2008). R: Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL.http://www.R-project.org*
- Metwally, ME., Belal F., 1992, Primaquine Phosphate as a Promising Substitute for N-(1-Naphtyl)ethylenediamine I. Determination of Nitrite in Natural Waters in Egypt, *Analytical Sciences February 1992, Vol. 8*, Departement of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Mansoura, Mansoura, 35516, Egypt.
- Narayana, B., Sunil, K., A Spectrophotometric Methode for Determination of Nitrite and Nitrate, 2009, *Eurasian J. Anal. Chem. 4(2): 201-214*, Department of P. G. Studies and Research in Chemistry, Mangalore University, Mangalangothri-574199, India.
- Notoatmojo, S., 2005, *Metodologi Penelitian Kesehatan*, Jakarta: Rineka Cipta.
- Rahway N. J., 2010, *Chemical and Reagent The Merck Index,ed 12th*, berlin, Merck and Co.
- Riyadi, W., 2009, *Validasi Metode Analisis*, Situs Kimia indonesia, [http://www.chemistry.org/artikel\\_kimia/kimia\\_analisis/validasi-metode-analisis](http://www.chemistry.org/artikel_kimia/kimia_analisis/validasi-metode-analisis).
- Shah, J., Jan, M. R., Khan, M. A., 2005, Determination of Furoamide Bay Simple Diazotation Methode in Pharmaceutical Preparation, *Journal of The Chinese Chemical Society, 52, 347-352*, Department of Chemistry, University of Peshawar, N. W. F. P., Pakistan.
- Sigma-Aldrich, 2012, *Material Safety Data Sheet Version 5.1 Sulfanilamide*, Sigma-Aldrich Corporation, USA
- Suharman, dan Mulja, HM., 1995, *Analisis Instrumental*, Surabaya, Airlangga University Press
- Suirta, I W., 2010, Sintesis Senyawa orto-fenilazo-2-naftol Sebagai Indikator Dalam Titrasi, *Jurnal Kimia 4 (1), Januari-2010:27-34, ISSN 1907-9850*, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Denpasar, Bali, Indonesia.
- Sunivo, 2012, *Material Safety Data Sheet (MSDS) 1-Naphthylamine*, Shanghai Sunivo Supplay Chain Management Co., Ltd, <http://www.sunivo.com/MSDS>
- Tebbutt, P., Sulfanilamide, 1998, *Molecule of the Month: Februari 1998*, Cherwell Scientific Publishing, USA
- Wade Jr, L. G., 2006, *organic Chemistry, Sixth Edition*, Person Education, USA