



**VALIDASI METODE SPEKTOFOTOMETER SERAPAN ATOM (SSA)  
UNTUK PENETAPAN KADAR KALSIMUM DALAM TULANG FEMUR  
TIKUS**

**SKRIPSI**

Oleh

**Ingerit Damayanti  
NIM 102210101071**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**VALIDASI METODE SPEKTOFOTOMETER SERAPAN ATOM (SSA)  
UNTUK PENETAPAN KADAR KALSIUM DALAM TULANG FEMUR  
TIKUS**

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Ingerit Damayanti  
NIM 1022010101071**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Hj. Sanis dan Ayahanda H. Redjo Santoso yang senantiasa selalu mendoakan dan mencurahkan kasih dan sayangnya, seorang motivator terhebat dalam hidupku yang tidak pernah lelah menemani, menuntunku menuju masa depan yang cerah dengan semua dukungan moril dan materil;
2. Kepada Kakak Amanah dan Nurma Santosa penulis, terima kasih atas segala doa dan dukungan dalam pengerjaan skripsi ini;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, terima kasih atas kesabarannya dalam memberikan ilmu pengetahuan dan bimbingannya kepada penulis;
4. Almamater tercinta, Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

Orang-orang hebat di bidang apapun bukan baru bekerja karena mereka terinspirasi, namun mereka menjadi terinspirasi karena mereka lebih suka bekerja. Mereka tidak menyia-nyiakan waktu untuk menunggu inspirasi

(Ernest Newman)

In every human being there is tremendous potential. But only those who work hard will achieve it

(Penulis)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ingerit Damayanti

NIM : 102210101071

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Validasi Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) untuk Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 September 2015

Yang menyatakan,

Ingerit Damayanti

NIM 102210101071

**SKRIPSI**

**VALIDASI METODE SPEKTOFOTOMETER SERAPAN ATOM (SSA)  
UNTUK PENETAPAN KADAR KALSIUM DALAM TULANG FEMUR  
TIKUS**

Oleh

Ingerit Damayanti  
NIM 102210101071

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Fifteen Aprilia Fajrin. S.Farm, M.Farm.,Apt

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul *Validasi Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) untuk Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus* telah di uji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada :

Hari : Kamis

Tanggal : 10 September 2015

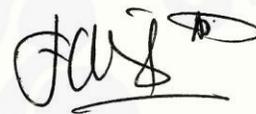
Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Dosen Pembimbing Utama,



Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si.  
NIP. 197806092005012004

Dosen Pembimbing Anggota,



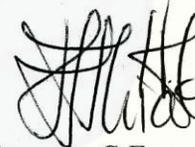
Fifteen Aprila Fajrin. S.Farm., Apt., M.Farm.  
NIP. 198204152006042002

Dosen Penguji I,



Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.  
NIP. 196902011994031002

Dosen Penguji II,



Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.  
NIP. 198204062006042001



Mengesahkan  
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.,  
NIP. 197604142002122001

**RINGKASAN**

**Validasi Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) untuk Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus;** Ingerit Damayanti, 102210101071; 2015; 67 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kalsium merupakan makromineral yang paling banyak terdapat di semua jaringan tubuh dan terlibat dalam proses biologi dan metabolisme tubuh. Tubuh manusia mengandung sekitar 1 kg kalsium. Sekitar 99% kalsium dalam tubuh ditemukan pada tulang dan gigi dan sekitar 1% terdapat pada cairan ekstra sel. Kalsium dalam tulang berupa mineral hidroksiapatit [ $CA_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ] (Flynn, 2003). Asupan kalsium yang kurang dapat meningkatkan prevalensi resiko patah tulang pada usia menua. Hal ini terjadi ketika kalsium dalam tulang mengalami ketidakseimbangan antara resorpsi dan pembentukannya. Sehingga dibutuhkan asupan kalsium untuk mengurangi resiko patah tulang (Douglas, 2013).

Penelitian yang dilakukan merupakan eksperimental laboratorium dengan jumlah sampel 12 ekor tikus dibagi dalam 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif (hanya diberi pakan standar 10% dari berat badan), kelompok perlakuan kalsium (dosis 0,09 g/ kg/ BB/ hari), perlakuan dilakukan secara peroral selama 25 hari. Pada hari ke-26, dilakukan pembedahan dan diambil tulang femur untuk menentukan kadar kalsium dalam tulang. Tulang femur selanjutnya difurnace untuk mendapatkan sampel yang nantinya akan diukur oleh alat *Spektrofotometer Serapan Atom* (SSA). Sebelum dilakukan pengukuran sampel untuk menentukan kadar kalsium dalam tulang femur, tahap berikutnya adalah dilakukan proses optimasi dan validasi metode. Proses optimasi meliputi: optimasi arus lampu, lebar celah, laju

asetilen, panjang gelombang dan konsentrasi uji. Validasi metode meliputi: uji linieritas, uji batas deteksi dan batas kuantitasi, uji presisi dan uji akurasi.

Hasil penelitian menunjukkan untuk kondisi optimum metode SSA untuk penetapan kadar kalsium yaitu digunakan pada penentuan kadar kalsium arus lampu sebesar 10 mA; lebar celah sebesar 0,2 nm; laju asetilen sebesar 1,6 L/menit.; dengan panjang gelombang 422,7 nm, dengan konsentrasi uji optimum adalah 10 ppm. Validasi metode yang telah dilakukan diperoleh hasil untuk uji liniertas nilai koefisien korelasi  $r = 0,99697$  menggunakan persamaan regresi linier dan  $V_{x0} = 4,7998\%$ ; dan nilai  $X_p = 4,6502$  ng. Uji batas deteksi dan batas kuantitasi dengan nilai  $BD = 0,6369$  ppm dan  $BK = 1,9107$  ppm. Uji presisi dengan nilai  $RSD = 1,86\%$ . Uji akurasi dengan nilai  $Mean Recovery \pm RSD = 100,726\% \pm 1,081\%$ . Dari hasil yang didapatkan metode SSA dapat dikatakan valid dan dapat digunakan untuk mengukur kadar kalsium dalam femur tikus. Hasil pengukuran kadar diperoleh kadar kalsium dalam tulang femur tikus diberi asupan kalsium sebesar (kadar kalsium  $\pm RSD$ )  $15,8\% \pm 1,14\%$  dan  $17,8\% \pm 1,80\%$ .

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulisan skripsi yang berjudul “*Validasi Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) untuk Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus*” dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar sarjana pada program pendidikan strata satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Dalam penulisan skripsi ini banyak kendala yang terjadi, namun berkat bantuan, bimbingan, kerjasama dari berbagai pihak dan berkah dari Allah SWT sehingga kendala-kendala yang dihadapi tersebut dapat diatasi. Untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Allah SWT, atas izin-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas kesempatan kesempatan yang telah diberikan untuk menyelesaikan tugas akhir;
3. Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Fifteen Aprila Fajrin. S.Farm, M.Farm.,Apt., selaku Dosen Pembimbing Anggota karena telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penyelesaian skripsi;
4. Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt., selaku Dosen Penguji II yang telah memberi saran dan kritik;

5. Bapak Dwi Koko Pratoko S.Farm., Apt., Ibu Lina Winarti, S.Farm., M.Sc., Apt.,; Ibu Indah Purnama Sari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama menempuh studi;
6. Ibu wayan, mbak hanny, mbak indri dan mbak dini terima kasih telah membantu saya selama masa penelitian.
7. Ibunda Hj. Sanis dan Ayahanda H. Redjo Santoso yang selalu memberikan kasih sayang, doa, semangat dan dukungan baik moril maupun materil. Tiada apapun di dunia ini yang dapat membalas semua kebaikan, cinta dan kasih sayang yang telah engkau berikan, kepada merekalah skripsi ini kupersembahkan
8. Mbak dan mas, Amanah dan Nurma Santosa yang secara tidak langsung telah banyak memberikan motivasi dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini;
9. Sepupu dan ponakan saya Mbak Mus, Moo Pina, Moo Yuni, Khusnul, Arel dan Ayesa yang selalu memberikan doa dan semangat.
10. Rekan-rekan skripsi seperjuangan, Indra Wijayanti, Mama Wimala, Khairun Nisa terima kasih sudah menemani dan terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan skripsi ini;
11. Sahabat-sahabatku, Indra Wiyanti, Rizky Triandari, Debby Zenitta Yasmaniar, Rina Arimurti Putri, Ika Ria Lestari dan Putri Larasari atas keceriaan, kebersamaan dan semangat yang selalu diberikan;
12. Rekan-rekan kosan jawa 2B No.1 Tika, Amel, Zia, Emah, Retno, Aik, Nuris, Oby terima kasih atas keceriaan, kebersamaan selama ini selama bertahun-tahun sehingga kita sudah menjadi seperti saudara,
13. Sahabat KKN khusnul, Mas Rendra, Bayu, Cindara, Afan, Efri, Cris, Dan Cosi terima kasih atas semua suka cita, kebersamaan dan pengalaman berharga yang tak terlupakan selama 45 hari;
14. Teman-teman angkatan 2010 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, terima kasih atas kebersamaan dan keceriaan yang telah dibina selama menempuh studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember;

Hanya ucapan terima kasih yang dapat penulis sampaikan. Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih belum sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran yang membangun, penulis akan sangat berterima kasih. Penulis berharap semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember, 10 September 2015

Penulis



**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xvi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvii
<b>DAFTAR RUMUS</b> .....	xviii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xix
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat</b> .....	4
<b>1.5 Batasan Masalah</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Kalsium</b> .....	5
2.1.1 Sumber Kalsium.....	6
2.1.2 Kelebihan dan Kekurangan Kalsium .....	6

2.1.3 Absorpsi dan Ekskresi Kalsium .....	7
<b>2.2 Tulang .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Tinjauan Umum Tentang Metode Analisis untuk Penetapan Kadar Kalsium .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Tinjauan Umum Tentang Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).....</b>	<b>11</b>
2.4.1 Prinsip Dasar Analisa Spektrofotometer Serapan Atom.....	11
2.4.2 Instrumentasi Spektrofotometer Serapan Atom .....	14
<b>2.5 Preparasi Sampel .....</b>	<b>16</b>
2.5.1 Desruksi Basah.....	16
2.5.2 Destruksi Kering .....	17
<b>2.6 Validasi Metode.....</b>	<b>18</b>
2.6.1 Uji Linieritas .....	18
2.6.2 Uji Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK) .....	19
2.6.3 Uji Presisi .....	20
2.6.4 Uji Akurasi (Ketepatan) .....	22
<b>BAB 3. METODE.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>25</b>
3.2.1 Rancangan Percobaan .....	25
<b>3.3 Alat dan Bahan.....</b>	<b>27</b>
3.3.1 Alat.....	27
3.3.2 Bahan .....	27
3.3.3 Subjek Uji .....	27
<b>3.4 Perlakuan Hewan Coba.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 Preparasi Sampel .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6 Optimasi Kondisi Analisis .....</b>	<b>28</b>
3.6.1 Optimasi Arus Lampu, Lebar Celah dan Laju Asetilen .....	28
3.6.2 Optimasi Panjang Gelombang .....	29

3.6.3 Optimasi Konsentrasi Uji.....	29
<b>3.7 Validasi Metode.....</b>	<b>30</b>
3.7.1 Uji Linieritas .....	30
3.7.2 Uji Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK).....	31
3.7.3 Uji Presisi .....	31
3.7.4 Uji Akurasi .....	32
<b>3.8 Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus dengan Metode SSA .....</b>	<b>33</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PENELITIAN .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Perlakuan Hewan Coba.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Optimasi Kondisi Analisis .....</b>	<b>35</b>
4.2.1 Optimasi Arus Lampu, Lebar Celah dan Laju Asetilen.....	35
4.2.2 Optimasi Panjang Gelombang .....	37
4.2.3 Optimasi Konsentrasi Uji.....	38
<b>4.3 Validasi Metode.....</b>	<b>39</b>
4.3.1 Linieritas .....	39
4.3.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK).....	41
4.3.3 Presisi .....	43
4.3.4 Akurasi .....	44
<b>4.4 Penetapan Kadar Kalsium .....</b>	<b>45</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>48</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>52</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Konsentrasi Analit Berbanding Presisi .....	22
2.2 Persen Perolehan Kembali (% recovery) Analit Pada Konsentrasi yang Berbeda .....	23
4.1 kelompok Perlakuan.....	35
4.2 Data Optimasi Konsentrasi Uji dengan Kadar Analit yang Berdeda.....	38
4.3 Kondisi Analisis Kalsium dengan Metode SSA.....	39
4.4 Hasil Uji Linieritas Kalsium .....	40
4.5 Hasil Uji BD dan BK Kalsium.....	42
4.6 Hasil Uji Presisi Repeatability Kalsium.....	44
4.7 Hasil Uji Presisi <i>Intermediate Precision</i> Kalsium.....	44
4.8 Hasil Uji Akurasi Kalsium .....	45
4.9 Hasil Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus yang tidak Diberi Asupan Kalsium.....	46
4.10 Hasil Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus yang Diberi Asupan Kalsium.....	46

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Tulang .....	09
2.2 Skema alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) .....	16
3.1 Diagram alur penelitian analisis kualitatif kalsium dalam tulang femur tikus dengan metode SSA .....	26
4.1 Arus lampu yang terpilih hasil optimasi .....	36
4.2 Lebar celah yang terpilih hasil optimasi .....	36
4.3 Laju asetilen yang terpilih hasil optimasi.....	37
4.4 Spektra panjang gelombang kalsium .....	38
4.5 Kurva linieritas konsentrasi vs absorbansi kalsium .....	41
4.6 Kurva linieritas konsentrasi vs absorbansi kalsium .....	42

**DAFTAR RUMUS**

	Halaman
2.1 Persamaan Lambert-Beer .....	12
2.2 Persen Relatif Standar Deviasi.....	21
2.3 Persen Perolehan Kembali .....	23
3.1 Penentuan Kadar Logam .....	34

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A Data Penimbangan Tikus .....	52
B Data Berat Tulang Femur .....	54
C Data Optimasi Laju Alir, Lebar Celah dan Laju Asetilen.....	55
D Data Optimasi Panjang Gelombang.....	56
E Data Optimasi Konsentrasi Uji .....	57
F Data Linieritas.....	57
G Data Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK) .....	58
H Data Presisi .....	59
I Data Akurasi.....	61
J Data Penetapan Kadar Kalsium pada Tulang Femur Tikus.....	65
K Foto Perlakuan dan Pembedahan .....	66

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kalsium merupakan makromineral yang paling banyak terdapat di semua jaringan tubuh dan terlibat dalam proses biologi dan metabolisme tubuh. Tubuh manusia mengandung sekitar 1 kg kalsium. Sekitar 99% kalsium dalam tubuh ditemukan pada tulang dan gigi dan sekitar 1% terdapat pada cairan ekstra sel. Kalsium dalam tulang berupa mineral hidroksiapatit [ $CA_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ] (Flynn, 2003). Peranan penting kalsium antara lain adalah untuk pertumbuhan, pembentukan tulang dan gigi, serta sebagai faktor pembantu dan pengatur reaksi biokimia dalam tubuh. Selain itu, kalsium berperan untuk mencegah terjadinya osteoporosis yaitu kondisi dimana tulang mengalami penurunan masa tulang, peningkatan kerapuhan tulang, dan peningkatan kerentanan yang berakibat patah tulang (Percival, 2000).

Kalsium banyak terdapat dalam susu, sayuran hijau, tahu, ikan, kacang-kacangan, terutama pada suplemen kalsium. Suplemen kalsium lebih baik untuk mendapatkan kalsium dibandingkan makanan. Hal ini dikarenakan dalam suplemen kalsium sudah tersedia dengan label yang mencangkup total milligram kalsium sehingga dapat mengetahui total kalsium yang dikonsumsi. Jumlah asupan kalsium yang dikonsumsi perhari tidak melebihi 1000-2500 mg perhari. Asupan kalsium yang kurang dapat meningkatkan prevalensi resiko patah tulang pada usia menua. Hal ini terjadi ketika kalsium dalam tulang mengalami ketidakseimbangan antara resorpsi dan pembentukannya. Sehingga dibutuhkan asupan kalsium untuk mengurangi resiko patah tulang (Douglas, 2013). Dalam jurnal Arifin *et al.*, (2010) dinyatakan bahwa suplementasi kalsium dan vitamin D dapat mengurangi *turnover* tulang berdasarkan penelitian, dengan respon lambat sekitar 6-8 pekan setelah CTX (*C-Telopeptide*). Resorpsi tulang berkurang dan menjadi stabil dengan suplementasi kalsium. Selain dapat mengurangi *turnover* tulang, pemberian kalsium juga berperan dalam

mempertahankan kadar kalsium, terutama pada hewan muda atau sedang dalam masa pertumbuhan (Tangalayuk *et al.*, 2015). Pemberian kalsium dalam ukuran nano  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  juga dapat meningkatkan efektivitas penyerapan kalsium pada tulang hewan (Aulyani, 2013). Pemberian suplemen kalsium diharapkan dapat meningkatkan kadar kalsium dalam tulang pada masa pertumbuhan dan dapat dijadikan salah satu alternatif terhadap penyakit akibat kelainan patologis (Arifin *et al.*, 2010). Untuk mengetahui efektifitas pemberian suplemen kalsium, salah satunya dapat dilakukan dengan menetapkan kadar kalsium dalam tulang femur tikus yang diberi asupan kalsium. Penetapan kadar kalsium dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya dengan metode gravimetri (Hendri *et al.*, 2007), kompleksometri (Hussain *et al.*, 2010). Metode-metode ini masih memiliki beberapa kekurangan yaitu diantaranya adalah membutuhkan waktu analisis yang lama, jumlah sampel yang dibutuhkan banyak dan memiliki hasil analisis yang kurang akurat. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan pengembangan suatu metode penetapan kadar kalsium dalam tulang femur tikus dengan Spektrofometer Serapan Atom (SSA).

Metode SSA dipilih karena memiliki beberapa kelebihan diantaranya metode ini cepat (10-15 detik per sampel per elemen), bahan yang digunakan sedikit, dapat mengukur kadar logam dalam jumlah kecil dan spesifik untuk setiap logam tanpa dilakukan pemisahan (batas deteksi kurang dari 1 ppm), pelaksanaannya relatif sederhana, interferensinya sedikit, mempunyai kepekaan yang tinggi dan batas limit deteksi yang rendah (<1 ppm), dari larutan yang sama beberapa unsur yang berlainan dapat diukur, hasil data (Absorbansi) dapat dibaca langsung (Gandjar *et al.*, 2007).

SSA merupakan metode yang digunakan untuk menentukan kadar suatu unsur dalam senyawa berdasarkan serapan atom pada gelombang tertentu, tergantung dari sifat unsurnya. Atom-atom yang menyerap energi radiasi pada SSA adalah atom-atom yang berada pada tingkat energi dasar (ground state). Penyerapan energi oleh atom-atom bebas menyebabkan terjadinya elektron tereksitasi. Intensitas sinar yang digunakan untuk eksitasi adalah sebanding dengan jumlah atom pada tingkat dasar yang menyerap tenaga sinar tersebut (Gandjar *et al.*, 2007).

Pengembangan metode analisis memerlukan validasi yang baik terhadap alat uji SSA maupun pada metode uji yang digunakan. Hal ini untuk membuktikan bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis tertentu. Menurut USP validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Rohman, 2009). Parameter validasi yang diuji dalam penelitian ini meliputi linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi dan akurasi.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Dari latar belakang di atas, maka dapat dibuat rumusan masalah yang meliputi:

- a. Bagaimanakah kondisi optimum penentuan kadar kalsium dalam tulang femur tikus dengan metode SSA?
- b. Apakah penentuan kadar kalsium dalam tulang femur tikus dengan metode SSA dapat memberikan hasil analisis yang linier, peka, presis dan akurat?
- c. Berapakah kadar kalsium dalam tulang femur yang diberi asupan kalsium?

## **1.3 Tujuan**

- a. Menentukan kondisi optimum penentuan kalsium dalam tulang femur tikus dengan menggunakan metode SSA.
- b. Menentukan validitas metode yang meliputi kelinieritas, kepekaan, keseksamaan serta keakuratan penentuan kadar kalsium dalam tulang femur tikus dengan metode SSA.
- c. Menentukan kadar kalsium dalam tulang femur tikus yang diberi asupan kalsium.

#### **1.4 Manfaat**

- a. Memberikan data ilmiah tentang karakteristik analisis kalsium dalam tulang femur tikus menggunakan metode SSA, sehingga didapatkan metode yang diketahui kelinieran, kespesifikan, kepekaan, kepresisian serta keakuratan.
- b. sebagai refrensi bagi mahasiswa untuk melakukan penelitian mengenai pengembangan metode SSA.

#### **1.5 Batasan Penelitian**

Tikus diberi asupan kalsium 0,09 g/ kg/ BB/ hari selama 25 hari (Bosscher *et al.*, 2005).

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kalsium

Kalsium merupakan makromineral yang digunakan untuk hidup, kesehatan dan pertumbuhan tulang. Kalsium merupakan makromineral yang paling banyak terdapat di semua jaringan tubuh dan terlibat dalam proses biologi dan metabolisme tubuh. Tubuh manusia mengandung sekitar 1 kg kalsium, Sekitar 99% kalsium dalam tubuh ditemukan pada tulang dan gigi dan sekitar 1% terdapat pada cairan ekstra sel. (Flynn, 2003) Dalam tulang, kalsium ada dalam bentuk mineral sebagai hidroksiapatit  $[CA_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . Kalsium dalam tulang dapat mempengaruhi kekuatan tulang melalui masa tulang. Jumlah asupan kalsium yang memadai akan menjadi faktor penting untuk perkembangan tulang secara normal selama proses pertumbuhan dan pemeliharaan masa tulang (Zhu, 2012). Kalsium tulang berada dalam keadaan seimbang dalam kalsium plasma pada konsentrasi kurang lebih 2,25-2,60 mmol/liter (9-10,4 mg/100 ml) (Almatsier, 2002).

Kalsium sangat penting untuk pembentukan tulang dan gigi pada masa pertumbuhan. Bila tubuh kekurangan kalsium, tubuh akan mengambil dari tulang dan bila terjadi terus-menerus, tulang dapat menjadi tipis, rapuh, dan mudah patah. Kebutuhan kalsium meningkat pada masa pertumbuhan, selama laktasi dan pada wanita *pasca menopause* (Douglas *et al.*, 2014). Asupan kalsium untuk orang yang lebih tua, banyak ahli merekomendasikan asupan 1.500 sampai 2.000 mg/hari untuk meminimalkan kehilangan tulang (Percival, 2000). Asupan kalsium juga perlu ditingkatkan bila makanan banyak mengandung protein atau fosfor. Jumlah kalsium yang dianjurkan perhari untuk anak-anak dengan usia 0-8 tahun sebesar 600 mg, 9-14 tahun sebesar 700 mg, 15-17 tahun sebesar 600 mg, dewasa sebesar 500 mg dan wanita hamil dan menyusui sebesar 1200 mg (AKG, 2013).

Kalsium memegang peranan penting di dalam cairan ekstraseluler dan intraseluler dalam mengatur fungsi sel, seperti untuk transmisi saraf, kontraksi otot, penggumpalan darah dan menjaga permeabilitas membran sel. Kalsium mengatur pekerjaan hormon-hormon dan faktor pertumbuhan (Almatsier, 2002). Fungsi penting dari Ca di luar sel (ekstraseluler) ialah mencegah terjadinya penggumpalan darah, gumpalan ini adalah merupakan protein yang tidak larut. Peranan Ca dalam sel (intraseluler) yang penting adalah dalam eksitasi saraf dan kontraksi otot (Darmono,1995). Kandungan kalsium yang tinggi sering dijumpai dalam tulang dan gigi, berhubungan dengan bentuk  $\text{OH}^-$  dan  $\text{PO}_4^{3-}$ . Ion  $\text{Ca}^{2+}$  juga ditemukan berhubungan silang dengan sel serabut dari kolagen protein yang merupakan konstituen dalam jumlah besar dari matriks organik tulang (Francis, 2006).

#### 2.1.1 Sumber Kalsium

Kalsium banyak terdapat dalam beberapa jenis makanan seperti susu, yoghurt, kacang-kacangan, tahu, tempe, dan sayuran hijau, tetapi kalsium tidak sepenuhnya dapat diabsorpsi sehingga sulit untuk mendapatkan jumlah kalsium yang cukup. Ketika asupan kalsium dari makanan sehari-hari tidak sesuai, maka diperlukan tambahan kalsium yang berasal dari luar tubuh yaitu dalam bentuk suplemen kalsium, sehingga jumlah kebutuhan kalsium setiap harinya dapat mencukupi dan penurunan massa tulang dapat dicegah. Suplemen kalsium yang biasa dikonsumsi adalah kalsium karbonat, kalsium sitrat dan kalsium sitrat malate (CCM). Suplemen kalsium tersedia dalam bentuk kapsul, tablet, tablet kunyah, bubuk dan likuid. Dalam mengkonsumsi kalsium yang perlu diperhatikan adalah bioavailability, ukuran tablet, dosis kalsium dalam satu tablet, bentuk sediaan kalsium (Peterson, 2005).

#### 2.1.2 Kelebihan dan Kekurangan Kalsium

Konsumsi kalsium hendaknya tidak melebihi 2500 mg sehari. Kelebihan

kalsium dapat menimbulkan batu ginjal atau gangguan ginjal. Disamping itu, dapat menyebabkan konstipasi (susah buang air besar). Hiperkalsemia yang sangat berat sering menyebabkan gejala kelainan fungsi otak seperti kebingungan, gangguan emosi, delirium (penurunan kesadaran), halusinasi. Kelebihan kalsium bisa terjadi bila menggunakan suplemen kalsium berupa tablet atau bentuk lain (Almatsier, 2002).

Kekurangan kalsium pada masa pertumbuhan dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan seperti tulang kurang kuat, mudah bengkok dan rapuh. Semua orang dewasa, terutama sesudah usia 50 tahun akan kehilangan kalsium dari tulangnya sehingga tulang menjadi rapuh dan mudah patah. Hal ini dinamakan osteoporosis yang dapat dipercepat oleh keadaan stres sehari-hari. Kekurangan kalsium juga dapat menyebabkan osteomalasia, yang dinamakan juga riketsia pada orang dewasa dan biasanya terjadi karena kekurangan vitamin D dan ketidakseimbangan konsumsi kalsium terhadap fosfor. Mineralisasi matriks tulang terganggu, sehingga kandungan kalsium di dalam tulang menurun (Almatsier, 2002).

### 2.1.3 Absorpsi dan Ekskresi Kalsium

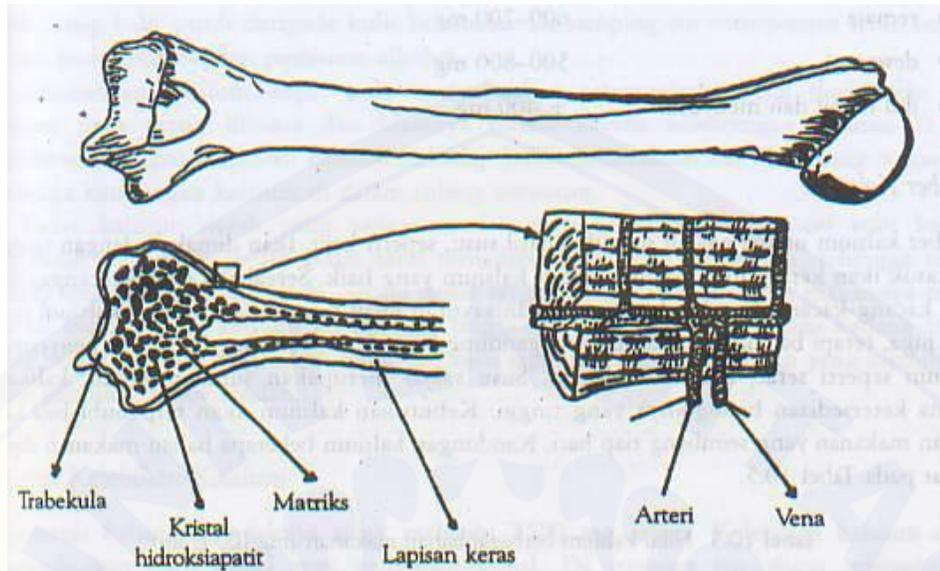
Kalsium dalam keadaan normal dikonsumsi dan diabsorpsi oleh tubuh sebanyak 30-50 %. Kemampuan absorpsi lebih tinggi pada masa pertumbuhan dan menurun pada proses menua (Arifin, 2010). Kemampuan absorpsi laki-laki lebih tinggi dari pada perempuan pada semua golongan umur. Absorpsi kalsium terutama terjadi di bagian atas usus halus yaitu duodenum. Kalsium membutuhkan pH 6 agar dapat berada dalam keadaan terlarut. Absorpsi kalsium terutama dilakukan secara aktif dengan menggunakan alat angkut protein pengikat kalsium. Absorpsi pasif terjadi pada permukaan saluran cerna. Kalsium hanya bisa diabsorpsi bila terdapat dalam bentuk larut air dan tidak mengendap karena unsur makanan lain seperti oksalat. Kalsium yang tidak absorpsi dikeluarkan melalui feses. Jumlah kalsium yang

diekskresi melalui urin mencerminkan jumlah kalsium yang absorpsi. Kehilangan kalsium melalui urin meningkat pada asidosis dan pada konsumsi fosfor tinggi. Kehilangan kalsium bisa terjadi melalui sekresi cairan yang masuk ke dalam saluran cerna dan melalui keringat (Almatsier, 2002).

## 2.2 Tulang

Tulang merupakan jaringan ikat khusus yang memberikan dukungan mekanik untuk tubuh, memfasilitasi aksi otot dan perlindungan organ vital. Tulang terdiri dari mineral kristal hidroksiapatit, fase organik (osteoid), serat kolagen, dan substansi dasar yang dibentuk oleh glikoprotein dan proteoglikan. Ada dua tipe tulang yaitu tulang kompak dan tulang spogi. Tulang kompak adalah tulang yang tebal dan padat yang memberikan bentuk pada tubuh, berfungsi sebagai proteksi. Sedangkan tulang spogi adalah tulang yang terdiri dari lapisan tipis, biasanya berada diakhir tulang panjang dan berfungsi sebagai aktivitas metabolik. Tubuh sendiri terdiri dari 80-90% tulang kompak dan 15-25% tulang spogi (Flynn, 2003). Ada tiga jenis sel yang memproduksi dan mempertahankan tulang, di antaranya adalah:

- a. Osteoblast (sel pembentuk tulang): adalah sel yang mengeluarkan osteoid dan modula kristalisasi hidroksiapatit
- b. Osteoklas (sel penghancur tulang): yang bertanggung jawab untuk resorpsi tulang untuk perbaikan permukaan tulang dan remodeling tulang.
- c. Osteosit: osteoblas yang telah tertanam dalam wilayah mineralisasi tulang dan terlibat dalam penginderaan dan terjemahan informasi tentang lingkungan internal tulang. Gambar morfologi tulang femur dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Anatomi Tulang. (Almatsier, 2003)

### 2.3 Tinjauan Umum Tentang Metode Analisis untuk Penetapan Kadar Kalsium

Penetapan kadar kalsium dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya adalah dengan metode SSA (Alfian, 2015; Petrovich *et al.*, 2007), gravimetri (Hendri *et al.*, 2007) dan kompleksometri (Hussain *et al.*, 2010). Penetapan kadar kalsium dengan menggunakan metode SSA (Spektrofotometri Serapan Atom) dalam penelitian Alfian (2015), digunakan sampel dari susu sapi murni dan susu sapi komersial. Determinasi dilakukan pada panjang gelombang 422,7 nm, proses destruksi yang dilakukan adalah destruksi kering. Menurut hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa kadar logam kalsium (Ca) pada susu sapi murni dan susu sapi di pasaran perbedaannya cukup signifikan yaitu sekitar 0,7 ppm dalam 20 ml sampel (10 kali pengenceran).

Penetapan kalsium dengan menggunakan metode SSA (Spektrofotometri Serapan Atom) dalam penelitian Petrovich *et al.*, (2007). Determinasi dilakukan pada kondisi analisis sebagai berikut: panjang gelombang 422,7 nm, lebar celah 0,7 nm

dan menggunakan HCL (*Hollow Cathode Lamp*) (P/N N305-0218) yang digunakan untuk detriminasi kalsium dengan arus lampu 30 Ma. Pelarut yang digunakan adalah aquabides dan HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Pada validasi metode analisisnya menunjukkan linieritas yang baik dengan nilai koefisien korelasi (r): 0,9997; *standar deviasi* (SD) <5,4%; Untuk hasil yang diperoleh untk t-test berpasangan menunjukkan tingkat kepercayaan sebesar 95% untuk refrensi bahan standart; % *recovery*: 93%-116%, Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK): 0,09 mg/L dan 0,30 mg/L.

Penetapan kadar kalsium dengan menggunakan metode gravimetrik dan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom) dalam penelitian Hendri *et al.*, (2007). Sampel digunakan kepala dan kulit udang windu. Pada penelitian ini telah dilakukan ekstraksi kitin dari kulit udang windu (*Penaeus monodon*) dengan pemisahan protein dan mineral melalui tahap deproteinasi dan demineralisasi. kondisi optimum untuk demineralisasi kulit udang windu adalah menggunakan HCl 2N pada suhu ruang (27°C) selama 12 jam, yang menghasilkan filtrat dengan kandungan Ca sebesar 23,47 gram/L. Tingkat kemurnian CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub> yang didapat sebesar 94,6% dengan kandungan MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> sebesar 85,7% dengan kandungan Ca sebesar 0,044%.

Penetapan kadar kalsium dengan menggunakan metode kompleksometri dan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom) dalam penelitian Hussain *et al.*, (2010). Sampel yang digunakan adalah susu dari beberapa merk dari pasar lokal. Determinasi kalsium yang dilakukan dengan kompleksometri, sampel ditambahkan dengan KOH, ditambahkan patton dan indicator pembaca besi. Selanjutnya dititrasi dengan larutan EDTA. Untuk pelarut yang digunakan dalam penentuan kalsium dengan metode SSA adalah air terionisasi dan asam nitrat. Hasil yang diperoleh standar deviasi (SD) untuk SSA dan tritasi EDTA: 0,28 dan 0,43, dan diperoleh kalsium dengan konsentrasi tertinggi dibandingkan logam yang lain.

## 2.4 Tinjauan Umum Tentang Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)

Spektrofotometer serapan atom merupakan salah satu metode analisis berdasarkan pada pengukuran banyaknya intensitas sinar yang diserap oleh atom-atom bebas dari logam yang dianalisis. Atom-atom yang menyerap energi radiasi pada SSA adalah atom-atom yang berada pada tingkat energi dasar (*ground state*). Penyerapan energi oleh atom-atom bebas menyebabkan terjadinya elektron tereksitasi. Intensitas sinar yang digunakan untuk eksitasi adalah sebanding dengan jumlah atom pada tingkat dasar yang menyerap tenaga sinar tersebut. Dengan demikian konsentrasi unsur dalam sampel dapat ditentukan dengan mengukur intensitas sinar yang diserap (absorbansi) atau mengukur intensitas sinar yang diteruskan (transmitansi) (Pecsok *et al.*, 1976).

### 2.4.1 Prinsip Dasar Analisa Spektrofotometri Serapan Atom

#### a. Atomisasi

Yaitu perubahan bentuk unsur yang akan dianalisis dari bentuk ion menjadi atom bebas dalam keadaan dasar. Untuk memperoleh atom bebas dalam keadaan dasar, diperlukan energi yang cukup besar. Pada SSA energi tersebut diperoleh dari energi panas nyala api, yang dihasilkan oleh pembakaran campuran antara gas pembakar dengan oksidan, tergantung dari temperatur nyala yang dikehendaki. Sistem pengatoman dengan nyala api sering disebut dengan istilah “*Burner Nebulizer*” yang terdiri atas sistem pengabut (*nebulizer*) dan sistem pembakar (*burner*).

Apabila cahaya dengan panjang gelombang tertentu dilewatkan pada suatu sel yang mengandung atom-atom bebas yang bersangkutan maka sebagian cahaya tersebut akan diserap dan intensitas penyerapan akan berbanding lurus dengan banyaknya atom bebas logam yang berada dalam sel.

Hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi diturunkan dari:

1. Hukum *Lambert*: Bila suatu sumber sinar monokromatik melewati medium transparan, maka intensitas sinar yang diteruskan berkurang dengan bertambahnya ketebalan medium yang mengabsorpsi.

2. Hukum *Beer*: Intensitas sinar yang diteruskan berkurang secara eksponensial dengan bertambahnya konsentrasi spesi yang menyerap sinar tersebut.

Pada analisis kuantitatif secara spektrofotometri serapan atom hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi dapat dinyatakan dengan persamaan *Lambert-Beer* dibawah ini:

$$A = \log (1/T) = \epsilon.b.c \dots\dots\dots(2.1)$$

Keterangan: A adalah absorbansi,  $\epsilon$  absorpsivitas molar dalam  $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , b adalah tebal medium serapan (cm) dan c adalah konsentrasi atom (mol/liter).

Dalam metode SSA, sampel harus diubah ke dalam bentuk uap atom. Proses pengubahan ini dikenal dengan istilah atomisasi, pada proses ini contoh diuapkan dan didekomposisi untuk membentuk atom dalam bentuk uap. Secara umum pembentukan atom bebas dalam keadaan gas melalui tahapan-tahapan sebagai berikut:

- a) Penguapan pelarut, pada tahap ini pelarut akan teruapkan dan meninggalkan residu padat.
- b) Penguapan zat padat, zat padat ini terdisosiasi menjadi atom-atom penyusunnya yang mula-mula akan berada dalam keadaan dasar.
- c) Beberapa atom akan mengalami eksitasi ke tingkatan energi yang lebih tinggi dan akan mencapai kondisi dimana atom-atom tersebut mampu memancarkan energi.

b. Interaksi antara bahan dengan materi

Interaksi antara bahan dengan radiasi yaitu bila sejumlah sinar radiasi dengan panjang gelombang tertentu yang berasal dari lampu katoda cekung dilewatkan melalui sistem yang mengandung populasi atom dari unsur-unsur yang berada pada tingkat energi dasar yang sama atau yang sesuai akan terjadi interaksi antara sinar

dengan atom-atom. Transisi elektron dari suatu tingkat energi yang rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi hanya bisa terjadi apabila ada penyerapan sejumlah energi tertentu pada proses interaksi antara materi dengan berbagai energi. Keadaan pada tingkat energi yang lebih tinggi disebut atom berada pada keadaan tereksitasi, yang sifatnya tidak stabil dan akan kembali ke keadaan dasar (Sugiharto, 1992).

Pada analisis unsur menggunakan spektrofotometer serapan atom, keberadaan unsur-unsur lain bersama dengan analit di dalam sampel dapat menyebabkan terjadinya interferensi. Interferensi dimaksud menyebabkan absorbansi dari analit yang ditentukan menjadi lebih besar atau lebih kecil daripada absorbansi yang seharusnya. Interferensi yang sering terjadi di dalam pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer serapan atom antara lain interferensi spektral, interferensi matriks, interferensi ionisasi dan interferensi kimia (Elmer, 1982).

Interferensi spektra dapat terjadi apabila garis resonansi dari unsur-unsur dalam sampel yang akan dianalisis tumpang-tindih dengan garis resonansi dari analit. Adanya tumpang-tindih tersebut menyebabkan kadar analit yang diperoleh lebih tinggi dari sesungguhnya karena kontribusi unsur penginterferensi pada signal absorbansi atom analit. Penggunaan celah yang lebih sempit atau memilih panjang gelombang alternatif dapat mengatasi interferensi spektra atom analit. Interferensi matriks dapat menurunkan atau meningkatkan signal absorbansi unsur yang akan ditentukan. Interferensi dimaksud terjadi apabila sifat-sifat fisika (viskositas, tegangan permukaan) dari sampel berbeda dengan standar. Untuk mengatasi interferensi tersebut maka komposisi matriks dalam sampel dan standar harus dibuat semirip mungkin, atau dengan menggunakan metode adisi standar untuk analisis.

Adanya interferensi ionisasi terjadi jika suhu nyala dalam proses atomisasi terlalu tinggi sehingga memiliki cukup energi untuk menyebabkan ionisasi dari analit. Berkurangnya jumlah atom bebas dalam keadaan dasar akan menyebabkan berkurangnya serapan atomik. Penambahan unsur lain yang lebih mudah terionisasi seperti Na dan K ke dalam standar dan sampel dapat mengurangi interferensi yang dimaksud. Jenis interferensi pada spektrofotometri serapan atom yang paling dikenal

adalah interferensi kimia. Menurut Slavin (1978) interferensi kimia merupakan suatu permasalahan yang sering dijumpai pada penentuan berbagai unsur yang pengatomannya menggunakan nyala. Jika sampel yang dianalisis mengandung senyawa kimia yang sukar terdisosiasi oleh energi nyala menjadi atom-atom bebasnya (bersifat refraktori) atau dapat membentuk senyawa kimia yang bersifat refraktori dengan komponen-komponen yang ada di dalam sampel, maka jumlah atom analit yang dapat mengabsorpsi sinar akan lebih sedikit dari yang seharusnya.

Keuntungan Metode Spektroskopi Serapan Atom (SSA) :

- a) Mempunyai kepekaan yang tinggi dan batas limit deteksi yang rendah
- b) Dari larutan yang sama, beberapa unsur yang berlainan dapat diukur.
- c) Output data (Absorbansi) dapat dibaca langsung
- d) Cukup ekonomis
- e) Batas kadar yang dapat ditentukan adalah amat luas (ppm hingga %)
- f) Sistemnya relatif mudah.

#### 2.4.2 Instrumentasi Spektrofotometer Serapan Atom

##### a. Sumber radiasi

Sumber radiasi yang digunakan harus memancarkan spektrum atom dari unsur yang ditentukan. Spektrum atom yang dipancarkan harus terdiri dari garis tajam yang mempunyai setengah lebar yang sama dengan garis serapan yang dibutuhkan oleh atom-atom. Sumber radiasi yang dipakai adalah lampu katoda berongga HCL (*hallow chatoda lamp*). HCL digunakan dengan mengalirkan listrik yang besarnya bergantung pada unsur yang akan dianalisis. Arus listrik tersebut sangat bervariasi antara 1-5 mA. Penggunaan arus listrik yang semakin tinggi dapat mengurangi masa kerja dari HCL (Ingle *et al.*, 1988).

##### b. Chopper

Chopper atau sistem atomisasi yang digunakan pada spektrofotometer serapan atom dapat berupa nyala atau elektrotermal. Spektrofotometer serapan atom yang

memiliki sistem atomisasi berupa nyala disebut *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (FAAS). Pada Sistem atomisasi nyala, larutan sampel yang mengandung logam dalam bentuk garam akan diubah menjadi aerosol dengan dilewatkan pada *nebulizer*, kemudian dengan adanya penguapan pelarut, butiran aerosol akan menjadi padatan. Setelah itu, terjadi perubahan bentuk dari padatan menjadi gas dan senyawa yang terdapat di dalam sampel akan berdisosiasi menjadi bentuk atom-atom (Cantle, 1982).

c. Nebulizer

*Nebulizer* digunakan untuk mengubah sampel menjadi atom-atom dalam bentuk gas. Fungsi *nebulizer* adalah menghasilkan kabut atau aerosol dari sampel. Sampel yang akan dikabutkan ditarik kedalam pipa kapiler, selanjutnya aksi semprotan udara yang ditiupkan melalui ujung kapiler, diperlukan aliran gas bertekanan tinggi untuk menghasilkan aerosol yang halus (Bassett dkk, 1994).

d. Monokromator

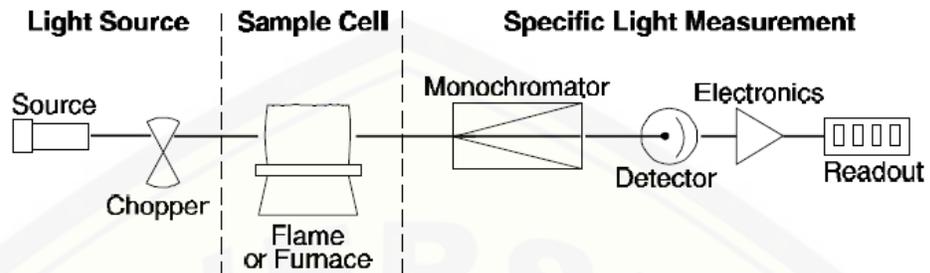
Monokromator pada spektrofotometer serapan atom berfungsi untuk memisahkan garis resonansi dari semua garis yang tidak diserap dan dipancarkan oleh sumber cahaya. Monokromator yang digunakan berupa kisi difraksi karena sebaran yang terjadi lebih seragam dibandingkan dengan prisma sehingga alat memiliki daya pisah yang baik (Cahyady, 2009).

e. Detektor

Detektor pada spektrotometer serapan atom berfungsi mengubah intensitas radiasi menjadi arus listrik. Pada spektrofotometer serapan atom yang umum dipakai sebagai detektor adalah tabung penggandaan foto. (PMT=*Photo Multiplier Tube*) (Mulja *et al.*, 1997).

f. Read Out

*Read Out* merupakan sistem pembacaan hasil. hasil pembacaan dapat berupa angka atau berupa kurva dari suatu recorder yang menggambarkan absorbansi atau intensitas emisi (Ganjar *et al.*, 1982).



Gambar 2.3. Skema Alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) (Elmer, 1996).

Keterangan gambar :

1. Suplai daya/sumber sinar
2. Chopper
3. Flame
3. Monokromator
4. Detector
5. Read Out

## 2.5 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dapat dilakukan dengan metode pengabuan kering (*dry ashing*) atau pengabuan basah (*wet digestion*). Pemilihan metode pengabuan tersebut tergantung pada sifat zat organik dan zat anorganik yang ada dalam bahan, serta logam berat yang akan dianalisa.

### 2.5.1 Dekstruksi basah

Dekstruksi basah yaitu pemanasan sampel (organik atau biologis) dengan adanya pengoksidasi kuat seperti asam-asam mineral baik tunggal maupun campuran. Jika dalam sampel ditambahkan zat pengoksidasi, lalu dipanaskan secara kontinu

pada waktu yang cukup lama, maka sampel akan teroksidasi sempurna sehingga meninggalkan berbagai elemen-elemen pada larutan asam dalam bentuk senyawa anorganik untuk dianalisis.

Dekstruksi basah pada prinsipnya adalah penggunaan asam nitrat untuk mendekstruksi zat organik pada suhu rendah dengan maksud mengurangi kehilangan mineral akibat penguapan. Dekstruksi basah pada umumnya digunakan untuk menganalisa arsen, tembaga, timah hitam, timah putih, dan seng.

Ada tiga macam cara kerja destruksi basah, yaitu :

1. Dekstruksi basah menggunakan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HClO}_4$ .
2. Dekstruksi basah menggunakan  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan  $\text{HClO}_4$ .
3. Dekstruksi basah menggunakan  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 2.5.2 Destruksi kering

Dekstruksi kering merupakan yang paling umum digunakan dengan cara membakar habis bagian organik dan meninggalkan residu anorganik sebagai abu untuk analisis lebih lanjut. Pada destruksi kering suhu pengabuan harus diperhatikan karena banyak elemen abu yang dapat menguap pada suhu tinggi, selain itu suhu pengabuan juga dapat menyebabkan dekomposisi senyawa tertentu. Oleh karena itu suhu pengabuan untuk setiap bahan berbeda-beda bergantung komponen yang ada dalam bahan tersebut.

Pengabuan kering dapat diterapkan pada hampir semua analisa mineral, kecuali merkuri dan arsen. Cara ini lebih membutuhkan sedikit ketelitian sehingga mampu menganalisa bahan lebih banyak dari pada pengabuan basah. (Apriyanto, 1989). Namun pada destruksi kering sering terjadi kehilangan unsur-unsur mikro tertentu karena suhu pemanasan yang tinggi, dapat juga terjadi reaksi antara unsur dengan wadah.

Menurut penelitian Annisa F. (2012) mengenai studi kandungan Pb dalam gorengan yang dijual di pinggir jalan yang menggunakan destruksi kering untuk

preparasi sampelnya. Destruksi kering diawali dengan menghaluskan sampel kemudian dipanaskan pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  untuk mengurangi kadar air dan minyaknya, kemudian diarangkan. Arang sampel diabukan pada suhu  $600^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam dalam *furnace*. Abu yang telah dingin dari tahap preparasi kemudian ditambahkan dengan  $\text{HNO}_3$  pekat 1 mL dan diencerkan dengan aquabides hingga total volume 10 mL. Tujuan penambahan  $\text{HNO}_3$  ini adalah untuk melarutkan logam yang telah terdestruksi dari sampel organik dalam proses kalsinasi (pengabuan), yaitu Ca. Kemudian campuran disaring dengan kertas saring, dan filtrat siap dianalisis dengan SSA.

## 2.6 Validasi Metode

Validasi metode adalah merupakan suatu proses pembuktian melalui pengujian analisis di laboratorium untuk memberikan data-data tentang kehandalan suatu metode dari suatu prosedur yang digunakan (Wegscheider, 1996). Hasil uji validasi dari pengembangan metode analisis dapat dinyatakan dalam beberapa parameter yaitu:

### 2.6.1 Uji Linieritas

Linieritas adalah suatu koefisien korelasi antara konsentrasi larutan standar baku dengan absorbansi yang dihasilkan yang merupakan suatu garis lurus. Metode analisis yang menggambarkan kemampuan suatu alat untuk memperoleh hasil pengujian yang sebanding dengan kadar analitik alat dalam sampel uji pada rentang konsentrasi tertentu atau untuk membuktikan adanya hubungan yang linier antara konsentrasi analit yang sebenarnya dengan respon alat. Uji linieritas suatu metode analisis dilakukan untuk membuktikan adanya hubungan antara konsentrasi analit terhadap respon detektor. Hubungan tersebut dianggap linier apabila harga koefisien korelasi dari perhitungan mendekati  $\pm 1$  bergantung pada arah garis kurva hubungan konsentrasi analit terhadap respon detektor (Harmita, 2004). Selain harga  $r$  sebagai penentuan parameter linieritas juga ditentukan berdasarkan harga  $S_y$  (simpangan

baku residual dari garis regresi),  $Sx_0$  (standar deviasi dari fungsi), dan  $Vx_0$  (koefisien variasi dari fungsi). Menurut Indrayanto & Yuwono (2003), persyaratan data linieritas untuk validasi metode dapat diterima jika memenuhi nilai koefisien korelasi lebih besar dari 0,99 atau memiliki nilai koefisien variasi fungsi ( $Vx_0$ ) yang lebih kecil dari 5 %.

### 2.6.2 Uji Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi adalah konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan konsentrasi terkecil dari analit yang dapat ditentukan dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima pada kondisi analitik yang dapat digunakan.

Menurut ICH penentuan Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantitation (LOQ) dapat menggunakan empat cara yaitu:

- 1) Metode Sinyal to Noise: batas deteksi adalah konsentrasi yang menghasilkan puncak dengan ketinggian minimal dua atau tiga kali lebih tinggi dari noise.
- 2) Inspeksi Visual: batas deteksi ditentukan oleh analisis sampel yang berisi konsentrasi analit dan batas deteksi merupakan konsentrasi minimum dimana analit masih dapat dideteksi.
- 3) Standar deviasi dari respon berdasarkan standar deviasi blangko: pengukuran besarnya respon latar belakang analisis dilakukan dengan menganalisis blangko dengan menghitung standar deviasi dari respon blangko. Selain itu, batas deteksi dan batas kuantitasi juga dapat ditentukan dari rasio standar deviasi respon blangko menggunakan standar deviasi residual dari garis kalibrasi atau standar deviasi *intercept* ( $s$ ) dan *slope* ( $S$ ) melalui rumus:

$$\text{Batas Deteksi} = 3,3 \frac{s}{S}$$

$$\text{Batas Kuantitasi} = 10 \frac{s}{S}$$

- 4) Standar deviasi dari respon berdasarkan kemiringan kurva kalibrasi: sebuah kurva kalibrasi tertentu dievaluasi dengan menggunakan larutan yang mengandung

analit dalam kisaran batas deteksi. Residual standar deviasi dari garis regresi, atau standar deviasi dari intersep dari  $y$  dapat digunakan sebagai standar deviasi. Pada pendekatan ini, nilai parameter linieritas seperti  $r$ ,  $V_{x0}$  dan  $X_p$  harus dipenuhi terlebih dahulu.

### 2.6.3 Uji Presisi

Presisi adalah suatu ukuran penyebaran (dispersi suatu kumpulan hasil), kedekatan dari suatu rangkaian pengukuran berulang-ulang satu sama lain. Presisi diterapkan pada pengukuran berulang-ulang sehingga menunjukkan hasil pengukuran individual didistribusikan sekitar nilai rata-rata tanpa menghiraukan letak nilai rata-rata terhadap nilai benar.

Presisi menggambarkan kesalahan acak dari suatu hasil pengukuran. Kesalahan acak berasal dari pengaruh-pengaruh yang tidak dapat diperkirakan, bervariasi terhadap ruang, dan bersifat sementara. Kesalahan acak sulit untuk dihindari, banyak berhubungan dengan instrument ukur, peralatan, contoh yang diukur, prosedur, dan lingkungan.

Presisi merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk menunjukkan kedekatan dari suatu seri pengukuran yang diperoleh dari sampel yang homogen.

Terdapat 3 kategori pengujian presisi, yaitu :

- a. Keterulangan/repeatabilitas, yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya. repeatabilitas dapat dinilai dengan pengukuran minimal 9 kali yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalnya 3 konsentrasi/3 replikasi). Selain itu, juga dapat dinilai dengan suatu pengukuran sebanyak minimal 6 kali pada 100% dari konsentrasi uji.
- b. Presisi Antara, yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang salah satunya berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.

c. Keseksamaan/reprodusibilitas, merupakan ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya. (Rohman, 2009).

Presisi dinyatakan presentase relative standart deviation (RSD%) dari seri pengukuran (sumardi, 2002).

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

$$\% RSD = \frac{SD}{x} \times 100\% \dots \dots \dots (2.2)$$

Dimana :

- Xi = kadar sampel
- X = kadar rata-rata sampel
- N = jumlah perlakuan

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium (Harmita, 2004). Menurut AOAC (2011), kriteria presisi dapat ditentukan dengan persen analit atau bahan aktif yang terkandung dalam sediaan yang ditunjukkan pada tabel 2.1 di bawah ini:

Tabel 2.1 Konsentrasi Analit Berbanding Presisi (AOAC, 2011)

Analit %	Rasio Analit	Unit	RSD %
100	1	100%	$\geq 1.3$
10	$10^{-1}$	10%	$\geq 1.9$
1	$10^{-2}$	1	$\geq 2.7$
0.01	$10^{-3}$	0.1	$\geq 3.7$
0.001	$10^{-4}$	100 ppm (mg/kg)	$\geq 5.3$
0.0001	$10^{-5}$	10 ppm (mg/kg)	$\geq 7.3$
0.00001	$10^{-6}$	1 ppm (mg/kg)	$\geq 11$
0.000001	$10^{-7}$	100 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$\geq 15$
0.0000001	$10^{-8}$	10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$\geq 21$
0.00000001	$10^{-9}$	1 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$\geq 30$

#### 2.6.4 Uji Akurasi (ketepatan)

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi atau kecermatan sering dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% *recovery*). Persen perolehan kembali (% *recovery*) diperoleh melalui pengukuran sejumlah analit yang diketahui kadarnya ditambahkan dalam sampel. Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu:

- Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*), yaitu pengukuran sejumlah analit bahan murni yang ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. Penentuan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80%-120% dari kadar analit yang diperkirakan.
- Metode penambahan standar atau pembandingan (*standard addition method*), yaitu menambahkan sejumlah tertentu analit dalam sampel yang telah dianalisis untuk selanjutnya dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Penambahan analit ditentukan dengan

menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30% – 60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003).

$$\% \text{ Perolehan Kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100 \dots \dots \dots (2.3)$$

Keterangan :

$C_F$  = Konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

$C_A$  = Konsentrasi sampel sebenarnya

$C_A^*$  = Konsentrasi analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

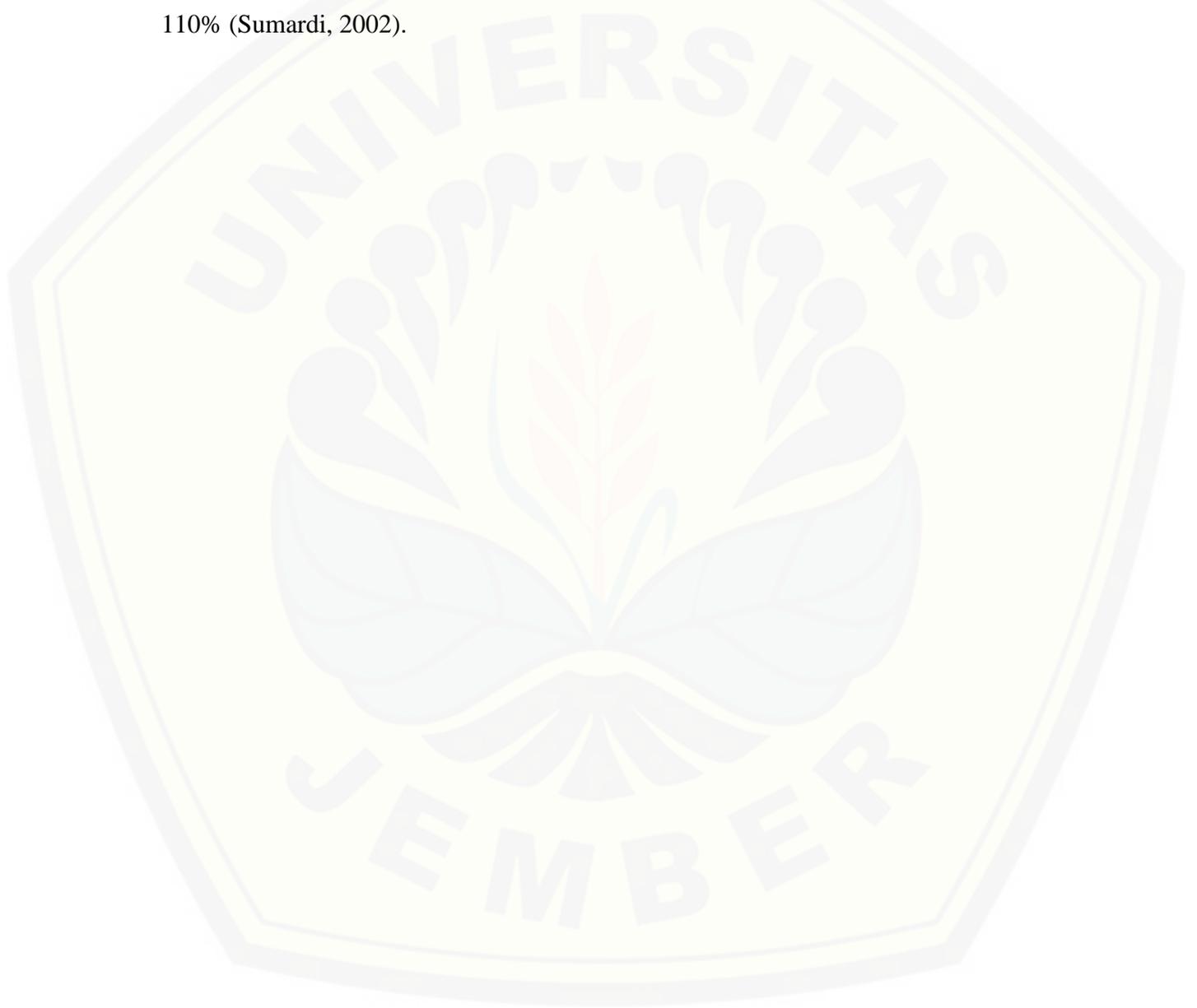
Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD (Harmita, 2004). Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel 2.2 dibawah ini. Jika nilai persen perolehan kembalinya diluar kisaran ini maka prosedur analisis harus dikaji ulang (Rohman, 2009).

Tabel 2.2. Persen Perolehan Kembali (*% recovery*) Analit pada Konsentrasi yang Berbeda (Huber, 2007)

<i>Active ingredient (%)</i>	Unit	<i>Mean Recovery (%)</i>
100	≥100%	98-102
≥10	≥10%	98-102
≥1	≥1%	97-103
≥0.1	≥0.10%	95-105
0.01	≥100 ppm	90-107
0.001	≥10 ppm	80-110
0.0001	≥1 ppm	80-110
0.00001	≥ 100 ppb	80-110
0.000001	≥10 ppb	60-115
0.0000001	≥1 ppb	40-120

Uji perolehan kembali (*recovery*) lebih sering digunakan dibanding dengan material standar dan metode baku, karena uji *recovery* lebih mudah dilakukan dan dengan biaya yang lebih murah. Uji perolehan kembali dilakukan untuk mengukur ketepatan hasil dari analisis yang telah dilakukan. Dicoba dua perlakuan yang

diambil dari satu contoh atau contoh yang sama, masing-masing satu untuk contoh yang ditambahkan standar dan satu lagi untuk larutan blangko (contoh tanpa penambahan larutan standar). Uji akurasi dapat diukur dengan menentukan presentase perolehan kembali (% *recovery*) dari analit yang ditambahkan ke dalam contoh. Suatu metode dikatakan valid apabila nilai presentase *recovery* dari suatu standar antara 90-110% (Sumardi, 2002).



## **BAB 3. METODE**

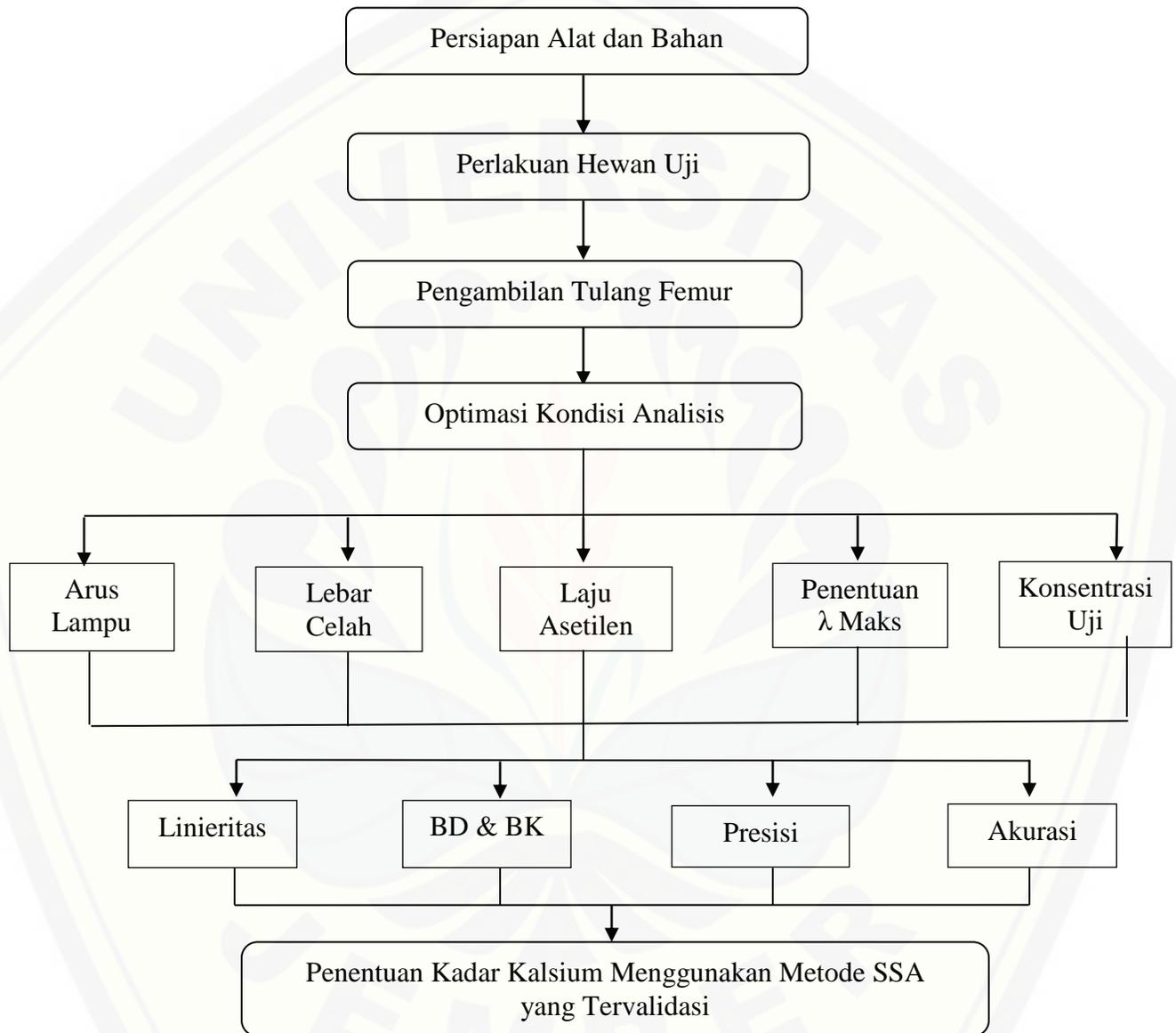
### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juni 2014 bertempat di Laboratorium Biomedik Farmasi Universitas Jember untuk perlakuan hewan uji dan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jember untuk pengukuran kadar kalsium.

### **3.2 Rancangan Penelitian**

#### **3.2.1 Rancangan Percobaan**

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) untuk penetapan kadar kalsium dalam tulang femur tikus. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu persiapan alat dan bahan, perlakuan hewan uji yang digunakan sebagai sampel, pengambilan tulang femur hewan uji, optimasi kondisi analisis yang meliputi: optimasi arus lampu, lebar celah, laju asetilen, penentuan panjang gelombang maksimum dan konsentrasi uji. Setelah diperoleh kondisi optimum untuk analisis, tahap selanjutnya dilakukan validasi dengan variabel analisa meliputi linieritas, Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK), presisi, dan akurasi. Tahap terakhir dari penelitian ini adalah penetapan kadar kalsium dalam tulang femur dengan metode yang telah tervalidasi.



Gambar 3.2 Diagram Alur Penelitian Analisis Kuantitatif Kalsium dalam Tulang Femur Tikus dengan Metode SSA

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah SSA (*Aurora Instrument 1200*), perangkat komputer dengan program AI 1200, *ultrasonic cleaner*, oven, lampu Ca, timbangan analitik Sartorius, *hot plate*, cawan porselen, labu ukur (50 mL, dan 100 mL) pyrex, erlenmeyer 100 mL pyrex, beaker glass (50 ml), pipet volume (0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL) pyrex, batang pengaduk, bola pipet dan pipet tetes.

#### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain  $\text{CaCO}_3$  p.a (MERCK), kalsium laktat,  $\text{HNO}_3$  p.a, aquabidest.

#### 3.3.3 Subjek Uji

Dalam penelitian ini digunakan hewan coba berupa tikus putih jantan galur Wistar dengan berat 150-200 gram berumur 2-3 bulan.

### 3.4 Perlakuan Hewan Coba

Sejumlah 12 ekor tikus putih jantan ditempatkan dalam kandang yang telah dipersiapkan. Tikus diberi makan konsentrat sebanyak 10% berat badan ( $\pm 20$ g) dan minum *ad libitum*. Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari di laboratorium. Setelah diadaptasikan, tikus dibagi dalam dua kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor yang terpilih secara acak. Kelompok satu (P0): tikus diberi pakan standar sebanyak 10% berat badan ( $\pm 20$  g); kelompok dua (P1): tikus diberi suplemen kalsium dosis 0,09g/kg/BB/hari. Suplemen kalsium dilarutkan dalam aquabidest dan diberikan secara peroral dengan *feeding tube* pada pagi hari selama 25 hari. Pada hari ke-26, tikus dikorbankan dengan cara inhalasi menggunakan kloroform, kemudian

dibedah untuk memperoleh tulang femur tikus untuk ditentukan kadar kalsium dengan menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

### 3.5 Preparasi Sampel

Tulang femur yang telah diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 110°C. Hal ini bertujuan mengurangi kadar air dalam tulang, tulang femur yang sudah dikeringkan selanjutnya diabukan. Tulang diabukan pada suhu 700°C selama 6 jam dalam *furnace*, kemudian didinginkan. Abu tulang yang telah dingin ditimbang sejumlah tertentu kemudian ditambahkan dengan HNO<sub>3</sub> pekat 1 mL dan diencerkan dengan pelarut hingga diperoleh total volume 50 mL. Kemudian dipipet kembali 10 ml, lalu diencerkan kembali hingga diperoleh total volume 50 mL. Tujuan penambahan HNO<sub>3</sub> ini adalah untuk melarutkan logam yang telah terdestruksi dari sampel organik dalam proses kalsinasi (pengabuan), yaitu Ca. selanjutnya sampel yang telah diperoleh dianalisis dengan SSA.

### 3.6 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi: optimasi arus lampu, lebar celah, laju asetilen, panjang gelombang, dan konsentrasi uji.

#### 3.6.1 Optimasi Arus Lampu, Lebar Celah, dan Laju Asetilen

Optimasi arus lampu, lebar celah, dan laju asetilen untuk penentuan kadar kalsium dilakukan sebelum sampel dianalisis. Proses dilakukan secara otomatis oleh alat. Optimasi dilakukan dengan memilih elemen yang akan dianalisis yaitu Ca, selanjutnya pada kotak dialog *flame method*, akan muncul data secara otomatis seperti arus lampu, lebar celah dan laju asetilen.

### 3.6.2 Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* element yang akan dianalisis pada Aurora Instruments dan *software* program AI 1200. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang 422,7 nm. Pemilihan panjang gelombang optimum dipilih secara otomatis oleh alat, yang bergantung pada jumlah HCL (*hallow chatoda lamp*) yaitu sekitar 70-80% dari kuat arus lampu katoda dan PMT *voltage* (*Photo Multiplier Tube*) (Elmer, 1996). Panjang gelombang maksimum yang terpilih pada atom Ca bergantung pada jumlah energi yang diserap oleh atom Ca pada konfigurasi elektron terluar sehingga elektron berpindah ke tingkat energi lebih tinggi. Hal ini menyebabkan ketidakstabilan pada atom sehingga elektron akan tereksitasi kembali ke tingkat energi dasar (*ground state*) dan mengemisikan energi dalam bentuk cahaya. Cahaya yang diemisikan memiliki panjang gelombang tertentu sesuai dengan perbedaan tingkat energi yang terlibat dalam proses emisi.

### 3.6.3 Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji analit dilakukan untuk memperoleh absorbansi yang maksimum dan dapat memberikan signal yang optimum dalam pengukuran. Selain itu, pemilihan konsentrasi uji analit juga mempertimbangkan efisiensi preparasi sampel yang dilihat berdasarkan jumlah pelarut maupun bahan yang dibutuhkan dan tahap-tahap preparasinya (perlu pengenceran atau tidak). Optimasi konsentrasi uji dilakukan dengan membuat beberapa konsentrasi uji dari standar dan sampel, konsentrasi standart yang digunakan adalah 0,1 ppm; 0,6 ppm; 4 ppm; 8 ppm dan 10 ppm. Sedangkan untuk konsentrasi sampel adalah 100 ppm.

Prosedur Optimasi:

Untuk membuat larutan standar diawali dengan pembuatan larutan standar induk kalsium karbonat 100 ppm dan 200 ppm. Larutan standar induk 100 ppm, dibuat dengan menimbang 24,97 mg kalsium karbonat yang dimasukkan dalam labu ukur 100 ml tambahkan beberapa tetes  $\text{HNO}_3$  sampai kalsium karbonat larut,

kemudian tambahkan pelarut ( $\text{HNO}_3$  dan aquabidest dengan perbandingan 1:100) sampai tanda. Dari larutan standar induk 100 ppm dipipet masing-masing 4; 8; 10 ml dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, ditambahkan pelarut sampai tanda (larutan kerja ini mempunyai konsentrasi 4; 8; 10 ppm). Larutan standar induk dua, dibuat dengan menimbang 49,94 mg tambahkan beberapa tetes  $\text{HNO}_3$  sampai larut, kemudian ditambahkan pelarut ( $\text{HNO}_3$  dan aquabidest dengan perbandingan 1:100) sampai tanda. Dari larutan standar induk 200 ppm dipipet 10 ml dilarutkan kedalam labu ukur 100 ml. sehingga diperoleh konsentrasi 20 ppm. Dari larutan standar 20 ppm dipipet masing-masing 0,5; 0,6 ml dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, ditambahkan pelarut sampai tanda (larutan kerja ini mempunyai konsentrasi 0,1; 0,6 ppm). Untuk larutan sampel dibuat dengan cara menimbang 25 mg sampel dimasukkan dalam labu ukur 50 ml tambahkan beberapa tetes  $\text{HNO}_3$  sampai kalsium karbonat larut. Kemudian dipipet kembali 10 ml, lalu diencerkan kembali hingga diperoleh total volume 50 mL. Kemudian tambahkan pelarut setelah itu larutan standar dan sampel diukur dengan menggunakan menggunakan SSA.

### 3.7 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis determinasi kalsium dalam tulang femur tikus dengan AAS meliputi berbagai parameter yaitu : linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, dan akurasi.

#### 3.7.1 Uji Linieritas

Dibuat dua larutan standar induk kalsium karbonat 100 ppm dan 200 ppm. Larutan standar 100 ppm, dibuat dengan menimbang 24,97 mg kalsium karbonat yang dimasukkan dalam labu ukur 100 ml tambahkan beberapa tetes  $\text{HNO}_3$  sampai kalsium karbonat larut, kemudian tambahkan pelarut ( $\text{HNO}_3$  dan aquabidest dengan perbandingan 1:100) sampai tanda. Dari larutan standar induk 100 ppm dipipet masing-masing 3; 5; 10; 25 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan

pelarut sampai tanda (larutan kerja ini mempunyai konsentrasi 3; 5; 10; 25 ppm). Larutan standar induk dua, dibuat dengan menimbang 49,94 mg kalsium karbonat yang dimasukkan dalam labu ukur 100 ml tambahkan beberapa tetes HNO<sub>3</sub> sampai larut, kemudian ditambahkan pelarut (HNO<sub>3</sub> dan aquabidest dengan perbandingan 1:100) sampai tanda. Dari larutan standar induk 200 ppm dipipet masing-masing 7,5; 10; 15 ml dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, ditambahkan pelarut sampai tanda (larutan kerja ini mempunyai konsentrasi 15; 20; 30 ppm) dan larutan standar yang sudah dibuat selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 422.7 nm. Dihitung nilai parameter linieritas dan rentang dihitung dari data hasil scanning dengan program *Validation Method of Analysis*. Kriteria penerimaan (*Acceptance Criteria*) dikatakan linier jika koefisien korelasi ( $r \geq 0,99$ ); Koefisien variasi fungsi ( $V_{xo} < 5\%$ ) (Indrayanto & Yuwono, 2003).

### 3.7.2 Uji Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Dibuat larutan standar kalsium karbonat dalam pelarut (HNO<sub>3</sub> dan aquabidest dengan perbandingan 1:100) dengan minimal 5 tingkat konsentrasi dibawah konsentrasi linieritas yaitu 50-300%. Larutan standar kalsium karbonat dibuat dengan menimbang sejumlah tertentu standar kalsium karbonat kemudian dilarutkan dengan pelarut, lalu diencerkan hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan yaitu 1 ppm; 1,6 ppm; 2 ppm; 2,4 ppm; 3 ppm. Larutan standar yang sudah dibuat diukur absorbansinya dengan SSA pada panjang gelombang 422.7 nm. Kemudian dihitung nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis* (Indrayanto *et al.*, 2003).

### 3.7.3 Uji Presisi

Pengujian parameter presisi yang dilakukan meliputi *repeatability* dan *intermediet pecision*. Uji presisi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kurva baku pada 6 tingkat konsentrasi dari konsentrasi linieritas. Kemudian dilakukan

preparasi sampel untuk *repeatability* dengan menimbang sejumlah sampel kalsium dalam tulang femur (6x replikasi) dan dilarutkan dalam pelarut hasil optimasi.

Penentuan *repeatability* dilakukan dengan mengukur absorbansi masing-masing larutan sampel yang sudah dibuat sebelumnya. Sedangkan untuk penentuan *intermediet precision* (presisi antara), prosedur diatas dilakukan sebanyak tiga kali pada tiga hari yang berbeda. Setelah itu, dihitung nilai parameter presisi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis* dan menghitung nilai SD dan RSD dimana nilai RSD tidak boleh lebih dari kriteria penerimaan studi kepresisian pada konsentrasi yang digunakan (Huber, 2007).

#### 3.7.4 Uji Akurasi

Pengujian parameter akurasi pada penelitian ini menggunakan metode standar adisi. Metode standar adisi merupakan standar yang umum digunakan untuk menganalisis logam mulia dan unsur yang memiliki ketelitian tinggi dan mempunyai akurasi tinggi >95% karena unsur matrik dan standar sama, sehingga penyimpangan dapat dieliminasi. Metode standar adisi dipilih karena metode ini mampu meminimalkan kesalahan yang disebabkan oleh perbedaan kondisi lingkungan (matrik) sampel dan standar. Pengujian akurasi dilakukan dengan beberapa tahap yaitu: pembuatan sampel adisi dengan penambahan standar sebanyak 30%, 45%, dan 60% dari konsentrasi analit dalam sampel sesuai dengan hasil uji presisi. Selanjutnya dilakukan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan konsentrasi linieritas.

Larutan standar dan sampel yang sudah dibuat diukur absorbansinya dengan SSA pada panjang gelombang 422,7 nm. Kemudian, dihitung nilai parameter akurasi dari data hasil *scanning* dengan program *Validation Method of Analysis*.

### 3.8 Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus dengan Metode SSA

Penetapan kadar kalsium dalam tulang femur diawali dengan pembuatan kurva baku dengan rentang sesuai dengan linieritas. Selanjutnya larutan sampel dipreparasi dengan menimbang sejumlah tertentu sampel kemudian dilarutkan dengan pelarut sesuai hasil optimasi, Kemudian larutan standar dianalisis dengan kondisi analisis (arus lampu, lebar celah, laju asetilen, panjang gelombang, konsentrasi uji) sesuai dengan hasil optimasi, sehingga diperoleh persamaan regresi. Nilai absorbansi yang diperoleh berada dalam nilai absorbansi kurva kalibrasi larutan baku dan absorbansi senyawa diukur dengan menggunakan persamaan garis regresinya. Dan untuk menghitung kadar logam dalam sampel dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Kadar logam } \left( \% \frac{b}{b} \right) = \frac{C \times V \times Fp}{BS} \times 100\% \dots \dots \dots (3.1)$$

Keterangan :

C : konsentrasi (mg/L)

V : volume larutan sampel (ml)

Fp : faktor pengenceran

BS : berat sampel (mg)

## **BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada penelitian ini telah dilakukan validasi metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) untuk penetapan kadar kalsium dalam tulang femur tikus. Tahap pertama yang dilakukan adalah mempersiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan. Sebelum dilakukan penentuan kadar kalsium dalam tulang femur tikus terlebih dahulu dilakukan pemberian perlakuan terhadap tikus dengan pemberian suplemen kalsium dengan dosis yang ditetapkan. Kemudian dilakukan optimasi kondisi analisis dan dilanjutkan dengan validasi metode analisis. Tahap terakhir dari penelitian ini adalah penetapan kadar kalsium dalam tulang femur dengan metode yang telah tervalidasi.

### **4.1 Perlakuan Hewan Coba**

Pada penelitian ini digunakan 12 ekor tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) umur 12 minggu dengan berat badan 150-200 g sebagai hewan percobaan. Dipilih tikus jantan pada penelitian ini karena metabolisme obat dari tikus jantan lebih cepat dibandingkan pada tikus betina. Selain itu pada tikus betina memiliki siklus menstruasi dan sistem hormonal yang nantinya dapat mempengaruhi data atau hasil dari penelitian ini. Dalam penelitian ini terdapat dua kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor yang terpilih secara acak. Kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan	Dosis
Kelompok 1 (P0)	Tikus diberi pakan standar sebanyak 10% berat badan ( $\pm 20$ g)
Kelompok 2 (P1)	Tikus diberi suplemen kalsium dosis 0,09g/kg/BB/hari

Perlakuan dilakukan selama 25 hari karena absorpsi kalsium pada proses pertumbuhan menunjukkan hasil yang baik dan signifikan selama 25 hari (Bosscher *et al.*, 2005). Selain itu proses *remodeling* tulang juga berlangsung kurang lebih selama 1 bulan. Pada hari ke-26, tikus dikorbankan dengan cara inhalasi menggunakan kloroform, kemudian dibedah untuk memperoleh tulang femur bagian kanan dan kiri. Tulang femur yang diperoleh dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 100°C. Keesokan harinya tulang femur tikus yang telah kering dimasukkan ke dalam *furnace* pada suhu 700°C sampai didapatkan serbuk tulang femur.

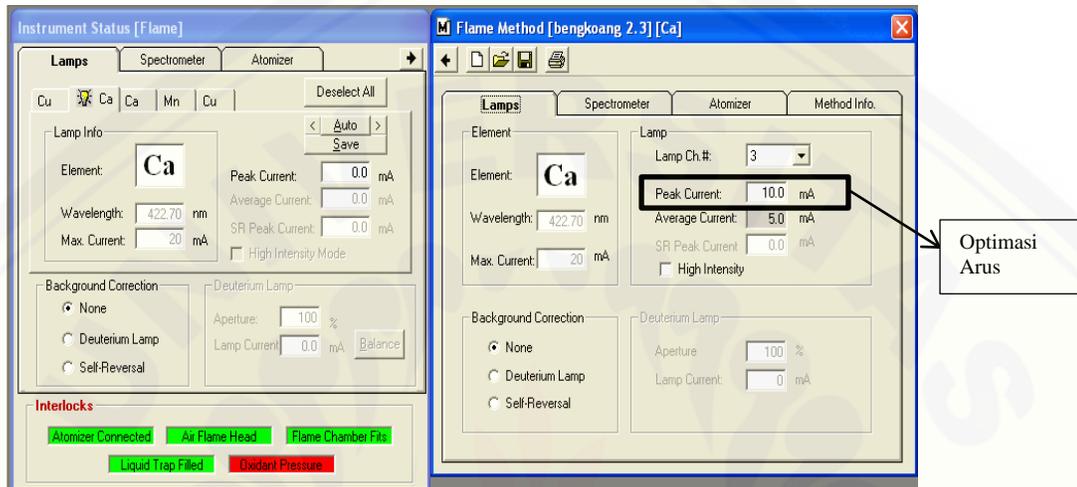
## 4.2 Optimasi Kondisi Analisis

Kondisi analisis yang perlu dioptimasi pada metode ini meliputi: optimasi arus lampu, lebar celah, laju asetilen, panjang gelombang dan konsentrasi uji.

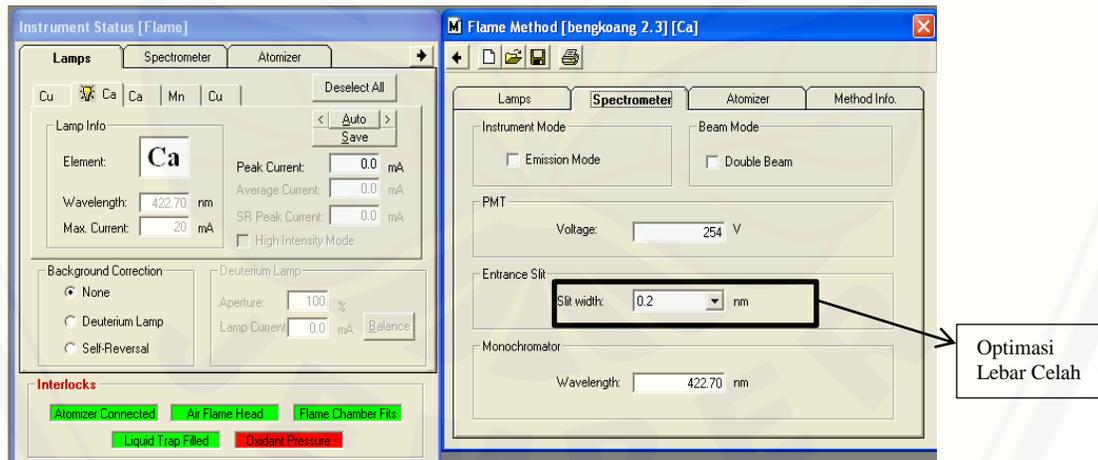
### 4.2.1 Optimasi Arus lampu, Lebar Celah dan Laju Asetilen

Optimasi arus lampu, lebar celah dan laju asetilen untuk penentuan kalsium dilakukan otomatis oleh alat. Prosesnya dilakukan secara bertahap, tahap pertama dimulai dari optimasi arus lampu, dilanjutkan dengan optimasi lebar celah dan yang terakhir optimasi laju asetilen. Semua data diperoleh dari buku panduan Aurora Instruments dan *software* program AI 1200. Untuk penentuan kadar kalsium arus

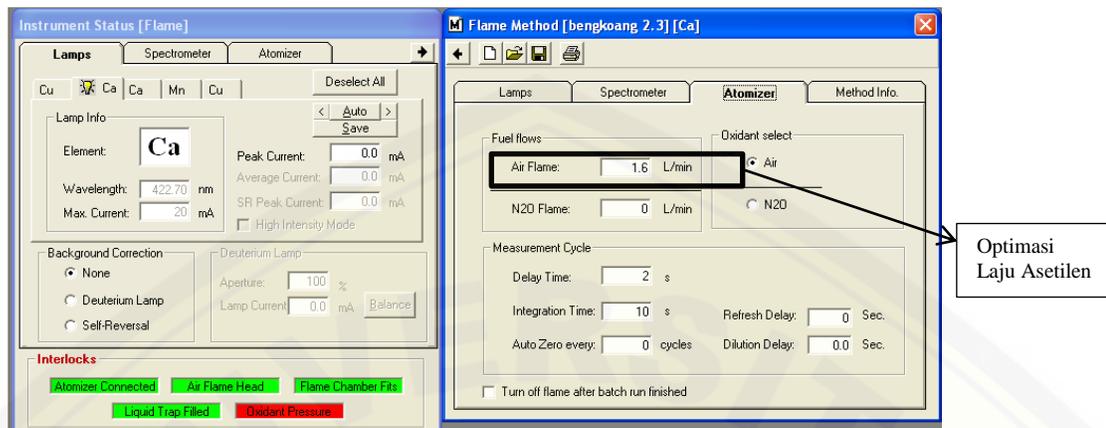
lampu sebesar 10 mA, lebar celah sebesar 0,2 nm, dan laju asetilen sebesar 1,6 L/menit. Hasil optimasi ditunjukkan pada gambar 4.1, 4.2 dan 4.3 berikut.



Gambar 4.1 Arus lampu yang terpilih hasil optimasi 10 mA.



Gambar 4.2 lebar celah yang terpilih hasil optimasi 0,2 nm.

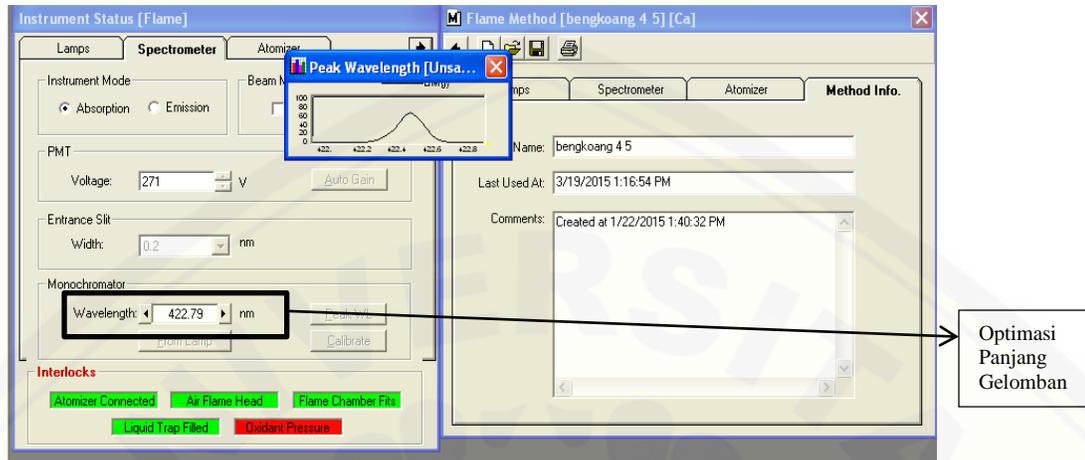


Gambar 4.3 laju asetilen yang terpilih hasil optimasi 1,6 L/menit.

#### 4.2.2 Optimasi Panjang Gelombang

Penentuan panjang gelombang untuk penentuan kalsium dilakukan dengan *scanning element* yang akan dianalisis pada Aurora Instruments dan *software* program AI 1200. Pada proses penentuan panjang gelombang yang digunakan untuk penentuan kalsium tidak membutuhkan standar ataupun sampel. Tahapan ini dilakukan otomatis oleh alat, yang bergantung pada jumlah HCL (*hallow chatoda lamp*) yaitu sekitar 70-80% dari kuat arus lampu katoda dan PMT *voltage* (*Photo Multiplier Tube*).

Panjang gelombang maksimum yang terpilih pada atom Ca adalah 422,7 nm. Pemilihan panjang gelombang maksimum bergantung pada jumlah energi yang diserap oleh atom Ca pada konfigurasi elektron terluar sehingga elektron berpindah ke tingkat energi lebih tinggi. Hal ini menyebabkan ketidakstabilan pada atom sehingga elektron akan tereksitasi kembali ke tingkat energi dasar (*ground state*) dan mengemisikan energi dalam bentuk cahaya. Cahaya yang diemisikan memiliki panjang gelombang tertentu sesuai dengan perbedaan tingkat energi yang terlibat dalam proses emisi. Berikut merupakan hasil optimasi panjang gelombang untuk penentuan kalsium dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Spektra kalsium pada panjang gelombang 422,79 nm

#### 4.2.3 Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji analit dilakukan untuk memperoleh konsentrasi yang optimum dalam pengukuran. Selain itu, pemilihan konsentrasi uji analit juga mempertimbangkan efisiensi preparasi sampel yang dilihat berdasarkan jumlah pelarut maupun bahan yang dibutuhkan dan tahap-tahap preparasinya. Data hasil optimasi konsentrasi uji dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data Optimasi Konsentrasi Uji dengan Kadar Analit yang Berbeda

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0,1	0.02523
0,6	0.04467
4	0.14110
8	0.25610
10	0.29750

Data pada tabel 4.2 menunjukkan bahwa optimasi konsentrasi uji yang dilakukan dengan variasi konsentrasi analit yaitu 0,1 ppm; 0,6 ppm; 4 ppm; 8 ppm; 10 ppm. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yaitu

422,7 nm. Berdasarkan hasil yang diperoleh, konsentrasi uji yang optimum adalah konsentrasi 10 ppm. Pemilihan konsentrasi uji ini berdasarkan pada nilai absorbansi optimum yaitu sekitar 0 sampai 1. Selain itu juga berdasarkan efisiensi preparasi sampel, semakin mudah preparasi sampel yang dilakukan maka akan mengurangi kesalahan yang memungkinkan hasil yang diperoleh sesuai dengan yang diinginkan.

Dari keseluruhan optimasi yang dilakukan, maka kondisi analisis yang paling optimum untuk penentuan kalsium dapat dilihat pada tabel 4.3 berikut.

Tabel 4.3 Kondisi Analisis Kalsium dengan Metode SSA

No.	Kondisi Analisis	Hasil Optimasi
1.	Arus Lampu	10 mA
2.	Lebar Celah	0,2 nm
3.	Laju Asetilen	1,6 L/menit
4.	Panjang Gelombang	422,7 nm
5.	Konsentrasi Uji	10 ppm

### 4.3 Validasi Metode Analisis

Pada penelitian ini parameter validasi metode analisis yang dilakukan meliputi: linieritas, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), selektivitas dan spesifisitas, presisi, dan akurasi.

#### 4.3.1 Linieritas

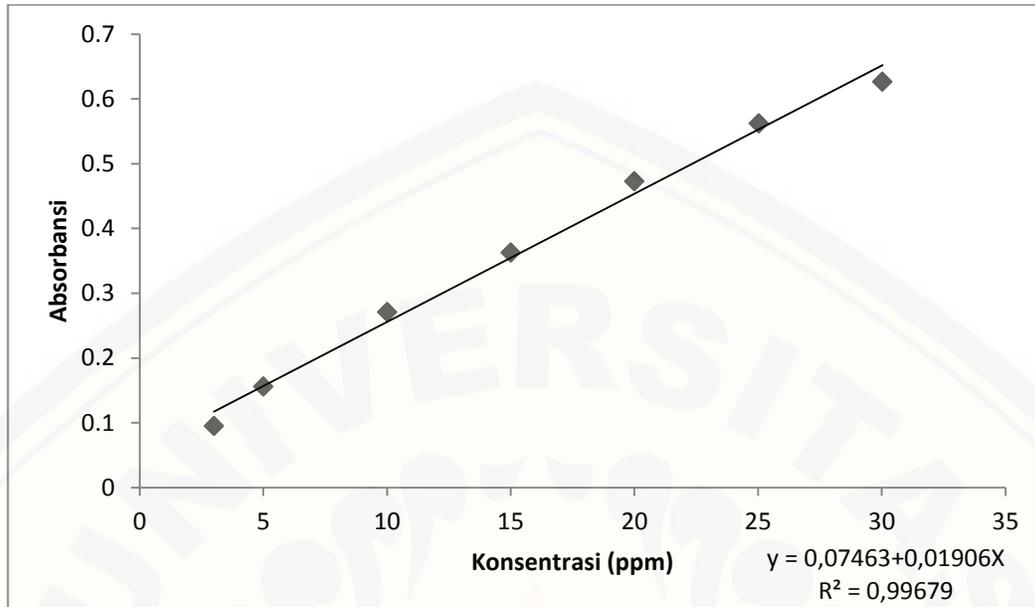
Menurut Harmita (2004), linieritas merupakan kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Penentuan linieritas minimal menggunakan lima macam konsentrasi atau lebih yang berkisar antara 0-200% dari konsentrasi uji. Pada penelitian ini, rentang konsentrasi yang digunakan untuk linieritas adalah 50-300% dari konsentrasi uji 10 ppm. Larutan standar yang telah dibuat diukur dengan SSA sehingga dihasilkan data kalkulasi standar kalsium. Data yang diperoleh dihitung menggunakan *software Validation*

*Method of Analysis.* Parameter linieritas ditentukan berdasarkan nilai  $r$  (koefisien korelasi),  $V_{x0}$  (standar deviasi relatif (RSD)) dari persamaan linieritas yang dihasilkan, dan nilai  $X_p$ . Menurut *software Validation Method of Analysis* parameter linieritas memenuhi jika nilai  $r > 0,99$ , nilai  $V_{x0} < 5\%$ , dan nilai  $X_p < \text{nilai konsentrasi linieritas terkecil yang digunakan}$ .

Berdasarkan tabel 4.4 dan gambar 4.5 dapat diketahui bahwa hasil uji linieritas menunjukkan hubungan yang proporsional antara konsentrasi dan absorbansi dengan nilai  $r = 0,9967$ ,  $V_{x0} = 4,7798\%$  dan  $X_p = 4,6502$  ppm. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi persyaratan linieritas.

Tabel 4.4 Hasil Uji Linieritas Kalsium

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
5,005	0,1558
10,00	0,2706
15,02	0,3627
20,00	0,4726
25,03	0,5621
30,00	0,6264
Persamaan regresi linier	$Y = 0,07463 + 0,01906X$ $r = 0,99679$ $V_{x0} = 4,7798\%$ $X_p = 4,6502$ ppm



Gambar 4.5 Kurva Linieritas konsentrasi vs absorbansi kalsium

#### 4.3.2 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

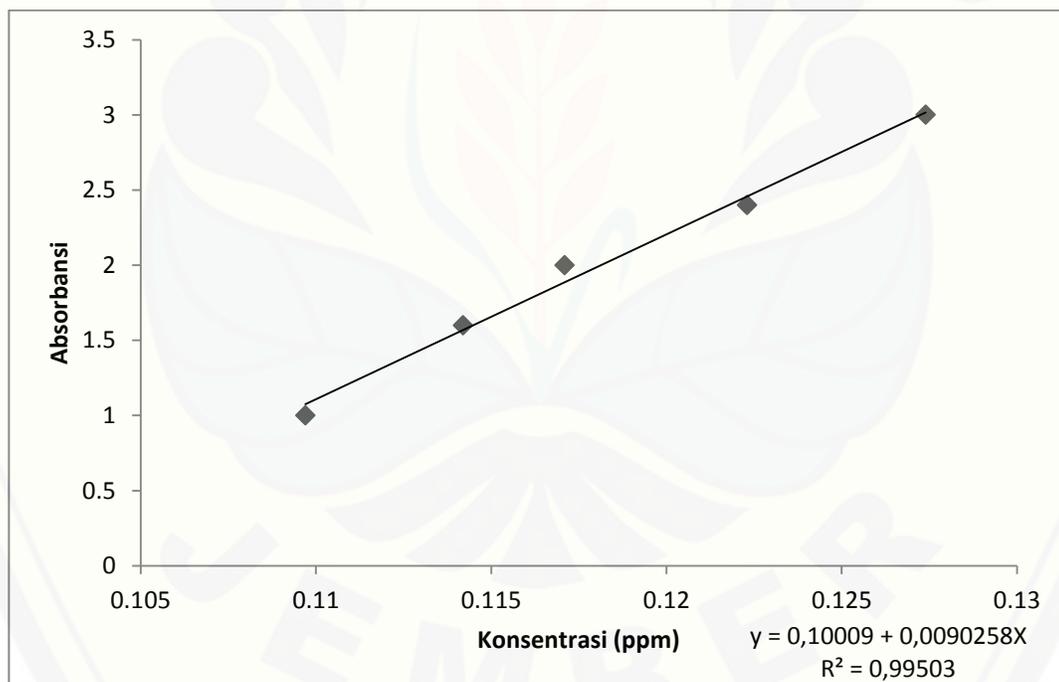
Untuk melihat kadar terkecil sampel yang masih dapat ditentukan oleh alat, maka dilakukan uji BD dan BK. Menurut Huber (2004), BD adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantitasi. BK adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Parameter linieritas harus terpenuhi terlebih dahulu sebelum melakukan uji BD dan BK, kemudian nilai BD dan BK dapat ditentukan menggunakan *software Validation Method of Analysis*. Rentang konsentrasi yang digunakan untuk uji BD dan BK adalah konsentrasi dibawah linieritas yaitu 5-30 ppm.

Berdasarkan pada tabel 4.5 dan gambar 4.6 dapat diketahui bahwa parameter linieritas terpenuhi pada rentang konsentrasi 1-3 ppm. Pada analisa kalsium diperoleh nilai BD yaitu 0,6369 ppm dan BK adalah 1,9107 ppm. Jadi dengan konsentrasi dibawah konsentrasi linieritas yaitu 1 ppm; 1,6 ppm; 2 ppm; 2,4 ppm dan 3 ppm

kalsium masih dapat dideteksi atau dibaca. Data perhitungan ditunjukkan pada lampiran G.

Tabel 4.5 Hasil Uji BD dan BK Kalsium

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1,00	0,1097
1,60	0,1142
2,00	0,1171
2,40	0,1223
3,00	0,1274
Persamaan regresi linier	$Y = 0,10009 + 0,0090258X$
$r > 0,99$	$r = 0,99503$
$V_{x0} < 5\%$	$V_{x0} = 4,3975\%$
$X_p < 1 \text{ ppm}$	$X_p = 0,6369 \text{ ppm}$



Gambar 4.6 Kurva Linieritas konsentrasi vs absorbansi kalsium

### 4.3.3 Presisi

Presisi merupakan ukuran kedekatan antar serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama. Presisi diukur berdasarkan nilai SD (simpangan baku) atau RSD/CV (simpangan baku relatif/standar deviasi relatif). Presisi dibagi menjadi *repeatability* (keterulangan), *intermediate precision* (presisi antara), dan *reproducibility* (keseksamaan). Pada penelitian ini, presisi yang dilakukan adalah *repeatability* dan *intermediate precision*.

Pada uji presisi *repeatability*, dilakukan pengukuran sampel sebanyak enam replikasi pada konsentrasi uji analit, yaitu 10 ppm. Data yang diperoleh dari ke-6 replikasi tersebut kemudian ditentukan nilai RSD. Syarat penerimaan uji presisi pada konsentrasi 10 ppm adalah  $RSD \leq 1,9\%$  (AOAC, 2011). Uji presisi *repeatability* dilakukan dalam satu hari, dimana analisis dan seluruh alat yang digunakan sama pada enam replikasi tersebut. Untuk menentukan presisi antara, dilakukan percobaan yang sama seperti pada uji presisi *repeatability*, namun percobaan dilakukan pada hari yang berbeda selama tiga hari.

Berdasarkan tabel 4.6 dan 4.7 dapat diketahui bahwa nilai RSD uji presisi *repeatability* dengan nilai RSD 1,72% dan nilai RSD pada uji presisi *intermediate precision* sebesar 1,86%. Nilai RSD yang didapat telah memenuhi syarat penerimaan uji presisi yaitu  $\leq 1,9\%$  (AOAC, 2011). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode analisis ini dapat memberikan hasil analisis yang presisi.

Tabel 4.6 Hasil Uji Presisi *Repeatability* Kalsium

Penimbangan (mg)	Massa Hasil percobaan (mg)	Kadar b/b
25,0	4,82	19,3%
25,1	4,91	19,5%
25,1	4,95	19,7%
25,0	4,91	19,6%
25,0	4,97	19,9%
25,0	4,74	18,9%
	Rata-rata	19,5%
	RSD/CV	1,72%

Tabel 4.7 Hasil Uji Presisi *Intermediate Precision* Kalsium

Hari Ke-	Kadar b/b	RSD (n=6)
1	19,5%	1,72%
2	19,6%	1,98%
3	19,5%	1,90%
	Rata-rata RSD/CV	1,86%

#### 4.3.4 Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya, yang ditentukan berdasarkan nilai % *recovery* (perolehan kembali) analit yang ditambahkan. Metode uji akurasi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode standar adisi karena tidak bisa membuat plasebo (tulang tanpa kalsium) sebagai matriks sampel.

Uji akurasi dilakukan dengan menghitung % *recovery* yang dihasilkan dari penambahan standar sebanyak 30%, 45%, dan 60% dari kadar analit dalam sampel yang didapat dari hasil uji presisi. Data perhitungan dapat dilihat pada lampiran I. Pengukuran tiap sampel adisi direplikasi sebanyak tiga kali. Berdasarkan tabel 4.8 dapat diketahui untuk hasil % *recovery* dengan konsentrasi kalsium 10 ppm adalah % *recovery*  $\pm$  RSD = 100,726%  $\pm$  1,081%. Menurut AOAC 2011, persyaratan untuk konsentrasi 10 ppm berada dalam rentang 98-102% dengan RSD  $\leq$  1,9%. Hasil yang

didapat tersebut memenuhi persyaratan uji akurasi. Dari hasil yang didapatkan di atas, dapat disimpulkan bahwa metode analisis ini menghasilkan data yang akurat.

Tabel 4.8 Hasil Akurasi Kalsium

Penambahan Standar	Penimbangan Sampel Adisi (mg)	Massa Kalsium Teoritis (mg)	Massa Kalsium Hasil Percobaan (mg)	Recovery (%)	RSD (%)
30%	25,0	1,277	1,272	99,608	0,391
	25,0	1,277	1,282	100,391	
	25,0	1,277	1,277	100,000	
45%	25,0	1,801	1,797	99,778	1,967
	25,0	1,801	1,862	103,387	
	25,0	1,801	1,857	103,109	
60%	25,0	2,266	2,249	99,250	0,885
	25,0	2,266	2,264	100,000	
	25,0	2,266	2,289	101,015	
Rata-rata				100,726	1,081%

Berdasarkan hasil pengujian parameter validasi diatas, yang meliputi linieritas, sensitivitas (BD dan BK), presisi dan akurasi diketahui bahwa metode analisis kalsium dengan SSA menghasilkan hasil analisis yang valid.

#### 4.4 Penetapan Kadar Kalsium

Penetapan kadar kalsium dilakukan setelah metode analisis yang dikembangkan dinyatakan valid dan melakukan penerapan metode analisis yang dikembangkan, yaitu melakukan penetapan kadar kalsium dalam tulang femur tikus dengan metode SSA. Hasil penetapan kadar kalsium pada sampel tersebut dapat dilihat pada tabel 4.9 dan 4.10 berikut.

Tabel 4.9 Hasil Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus yang Tidak Diberi Asupan Kalsium

Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar (%)
25,0	3,98	15,9
25,0	3,97	15,9
25,0	3,98	15,9
25,0	3,98	15,9
25,0	4,00	16,0
25,0	3,87	15,5
Rata-rata		15,8
SD/CV		1,14

Tabel 4.10 Hasil Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus yang Diberi Asupan Kalsium

Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar (%)
25,0	4,51	18,0
25,0	4,51	18,0
25,0	4,43	17,7
25,0	4,31	17,2
25,0	4,50	18,0
25,0	4,42	17,7
Rata-rata		17,8
SD/CV		1,80

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari tabel 4.9 dan 4.10 dapat diketahui bahwa kadar kalsium dalam tulang femur tikus yang tidak diberi asupan kalsium sebesar 15,8 %b/b dengan RSD 1,14% dan kadar kalsium yang diberi asupan kalsium sebesar 17,8 b/b dengan RSD 1,80% memenuhi rentang RSD yang dipersyaratkan yaitu  $\leq 1,9\%$  (AOAC, 2011).

Berdasarkan tahap-tahap penelitian yang telah dilakukan, meliputi optimasi kondisi analisis, validasi metode analisis, dan penetapan kadar pada sampel kalsium diketahui bahwa semua parameter validasi telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan, sehingga metode yang dikembangkan ini dapat dinyatakan valid dan memberikan hasil yang benar/sahih untuk analisis kadar kalsium dalam tulang femur

tikus. Jika dibandingkan dengan metode analisis lain yang sudah ada yaitu kompleksometri, metode ini mempunyai beberapa kelebihan diantaranya metode ini cepat (10-15 detik per sampel per elemen), bahan yang digunakan sedikit, dapat mengukur kadar logam dalam jumlah kecil dan spesifik untuk setiap logam tanpa dilakukan pemisahan (batas deteksi kurang dari 1 ppm), pelaksanaannya relatif sederhana, interferensinya sedikit, mempunyai kepekaan yang tinggi dan batas limit deteksi yang rendah ( $<1$  ppm), dari larutan yang sama beberapa unsur yang berlainan dapat diukur, hasil data (Absorbansi) dapat dibaca langsung. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode SSA ini dapat digunakan pada penetapan kadar kalsium dalam tulang femur tikus dengan hasil yang valid.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

- a. Kondisi optimum metode SSA untuk penetapan kadar kalsium yaitu digunakan pada penentuan kadar kalsium arus lampu sebesar 10 mA; lebar celah sebesar 0,2 nm; laju asetilen sebesar 1,6 L/menit.; dengan panjang gelombang 422,7 nm, dengan konsentrasi uji optimum adalah 10 ppm.
- b. Metode SSA untuk analisis kalsium dalam tulang femur tikus hasil analisis yang diperoleh:
  - 1) Linier dengan koefisien korelasi  $r = 0,99697$  menggunakan persamaan regresi linier dan  $V_{x0} = 4,7998\%$ ; dan nilai  $X_p = 4,6502$  ppm.
  - 2) Peka, dengan nilai  $BD = 0,6369$  ppm dan  $BK = 1,9107$  ppm
  - 3) Presisi/seksama, dengan  $RSD_{Repeatability} = 1,7226\%$ ; *Intermediate Precision* = 1,86%
  - 4) Akurat, dengan  $Mean Recovery \pm RSD = 100,726\% \pm 1,081\%$
- c. Kadar kalsium dalam tulang femur tikus yang diberi asupan kalsium sebesar (kadar kalsium  $\pm RSD$ )  $17,8\% \pm 1,80\%$ .

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil dan kesimpulan yang diperoleh, beberapa hal yang dapat dilakukan untuk penelitian lanjutan seperti: Perlu dikembangkan lagi penilaian parameter validasi yang lebih luas, seperti ketangguhan metode (*ruggedness*), kekuatan (*robustness*), maupun uji SST (*System Suitability Test*) supaya bisa dilakukan dimanapun, kapanpun dan oleh siapapun.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alfian, Z. 2004. Penentuan Kadar Unsur Kalsium Pada Susu Sapi Murni Dan Susu Sapi Di Pasaran Dengan Metode Spektrofotometer Serapan Atom. *Jurnal Sains Kimia*. Vol. 8(1): 26-28.
- Almatsier, S. 2002. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- AOAC. 1998. *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA : Arlington, Virginia.
- Arifin, Z. Hestiantoro, A. Baziad, A. 2010. Pemberian Susu Yang Difortifikasi Kalsium Kadar Tinggi dan Vitamin D dalam Memperbaiki Turnover Tulang Perempuan Pascamenopause. *Maj Obstet Ginekol Indonesia*. Vol 34(1): 31-38.
- Aulyani, T. L. 2013. *Pemberian Kalsium Nano  $Ca_3(PO_4)_2$  Terhadap Efektivitas Penyerapan Kalsium Tulang Hewan Model Tikus Putih *Rattus norvegicus**. Skripsi. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Basset, J., Denney, R.C., Jeffery, G.H dan Mendham, J. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisa Kuantitatif Anorganik Edisi Keempat*. Jakarta: EGC.
- Borner, F. 1994. Calcium and Osteoporosis. *The American Journal of clinical Journal*. Vol. 60: 831-836.
- Cantle, J. 1982. *Atomic Absorption Spectrometry Vol 5*. Netherland: Elsevier Scientific Publishing.
- Darmono. 1995. *Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup*. Cetakan I. Jakarta: UI Press.
- Deborah, A.S., Canyon, R. 2007. Calcium Supplementation in Clinical Practice: A Review of Forms, Doses, and Indications. *Nutr Clin Pract*. Vol. 22: 286-296.
- Douglas, C., Bauer, M.D. Calcium Supplements and Fracture Prevention. 2014. *The New England Journal of Medicine*. 1539-1543.

- Elmer, P. 1996. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy*. United States: The Perkin-Elmer Corporation.
- Francis, R.M., Anderson, F.H., Patel, S. Sahota., dan Van staa, T.P. 2006. Calcium and Vitamin D in The Prevention of Osteoporotic Fractures. *Q J Med*. Vol. 99:355–363.
- Flynn, A. 2003. The Role of Dietary Calcium in Bone Health. *Proceedings of The Nutrition Society*. Vol. 62: 851-858.
- Gandjar, I.G dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis Cetakan Kedua*. Yogyakarta: Pustaka pelajar.
- Hanzlik, R.P., Flower, S.C., Fisher, D.H. 2005. Relative Bioavailability of Calcium from Calcium Formate, Calcium Citrate, and Calcium Carbonate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 313: 1217-1222.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol.1(3), 117-135. Desember 2004. Jakarta: Universitas Indonesia Press. [serial online]. <http://jurnal.farmasi.ui.ac.id/pdf/2004/v01n03/Harmita010301.pdf>. [18 September 2014]
- Hendri, J., Wardana., Ginting, I., dan Laila, A. 2007. Penentuan Kadar Ca dan Mg Pada Hasil Demineralisasi Optimum Kulit Udang Windu (*Penaeus Monodon*) Secara Gravimetri dan Spektroskopi Serapan Atom. *J. Sains MIPA*: Vol. 13(2): 93-99.
- Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2nd edition. New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Hussain, Z., Nazir, A., Shafique, U., Salman, M. 2010. Comparative Study for The Determination of Metals In Milk Samples Using Flame-AAS and EDTA Complexometric Titration. *Journal of Scientific Research*. Vol. 40(1).
- Indrayanto, G. dan Yuwono, M. 2003. *Validation of TLC Analyses in Encyclopedia of Chromatography*. Surabaya: Airlangga University Indonesia
- International Conference on Harmonisation/ICH. 1994. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2(1): 6.
- Ingle, J.D., Crouch, S.R. 1998. *Spectrochemical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall International.

- Khopkar, S.M. 1990. *Basic Concepts of Analytical Chemistry*. Penerjemah A. Saptorahardjo. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press. Hal. 274.
- Pecsok, R.L., Shields, L.D., Cairns, T., dan McWilliam, I.G. 1976. *Modern Methods of Chemical Analysis 2rd Edition*. New York: John Wiley and Sons.
- Percival, M. 2000. Bone Health and Osteoporosis. *Advanced Nutrition Publications Inc*. Vol. 5. No.1.
- Rivai, H. 1995. *Asas Pemeriksaan Kimia*. Cetakan I. Jakarta : UI-Press. Hal. 249.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rowe, C.R., Sheskey, P.J., dan Quinn, M.E. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth edition*. London.Chicago: Pharmaceutical Press.
- Salisbury, F.B dan Ross, C.W. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. Bandung: Penerbit ITB.
- Silvia. 2009. *Penetapan Kadar Kalsium Dalam Susu Sapi, Susu Sapi Kemasan dan Air Tajin Secara Spektrofotometri*. Skripsi. Medan : Universitas Sumatra Utara.
- Slavin, M. 1978. *Atomic Absorption Spectrometry*. New York: John Wiley and Sons.
- Sugiharto, E. 1992. *Atomic Absorbition Spectrometry*. Yogyakarta: UGM.
- Sumardi. 2002. *Validasi Metode Pengujian*. Jakarta: Pusat Standardisasi dan Akreditasi Sekretariat Jendral Depertemen Pertanian.
- Tangalayuk, R.R., Suarsana, I.Y., Utama, I.H. 2015. Kadar Kalsium dan Fosfor Pada Tikus Betina yang Diberi Tepung Tempe Rendah Lemak.
- Zhu, K., dan Prince,R.L. 2012. Calcium and Bone. *Clinical Biochemistry* . Vol.45: 936–942.

LAMPIRAN

**A. Data Penimbangan Tikus**

A.1 Tikus tidak diberi asupan kalsium

Tikus	Berat badan/tanggal								
	30	1	2	3	4	5	6	7	8
1	161	169	164	150	150	150.5	155.5	153	157.5
2	192	200	197	193	193	182	179.5	182	184
5	155	164.5	150.5	148.5	149	143.5	148.5	151	148.5
4	159.5	164.5	162.5	156.5	151	151	155	160	158
5	188	189	192.5	182	185	183	187	195.5	195.5
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
150	154	154	148.5	152	167	168.5	173.5	172	182
181	190.5	196.5	187	183.5	201	205.5	207	209.5	217
143	152	143.5	141	141	156.5	158	162	161.5	167
151	157.5	160.5	160.5	153.5	171	180.5	179	183	194.5
194.5	189.5	187.5	190.5	188	209.5	215	212	216	225
19	20	21	22	23	24				
182.5	181	189	194	191	192				
212.5	209	216	220	220.5	220.5				
166.5	164.5	167.5	169	170	170				
193.5	190.5	199	205	217	216.5				
225	226	233	236	248	249				

A.2 Tikus diberi asupan kalsium

Tikus	Berat badan/tanggal									
	29	30	1	2	3	4	5	6	7	
1	163	163	186	186	194,5	205,5	201	208	208,5	
2	161	161	186	183,5	181	199	196	196	196	
3	197,5	197,5	207	209	200	223,5	217	220	224	
4	175	175	200	191	185	202,5	192	193,5	189	
5		178,5	168	167,5	164,5	172,5	160,5	167,5	165	
6		148	147	143,5	141	146,5	139,5	141	157,5	
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
210	214,5	217,5	224	232,5	252,5	229	232	234	232	235,5
198	207	203	213,5	219	217	219	223,5	224	225,5	230,5
223	232	228,5	193	224,5	241,5	243	243	245,5	240,5	243
188,5	195	193	202,5	208,5	215	214	212	217	217	224
161	164	166	171	176	10,5	174,5	175	178	173,5	179
145	144	145	149,5	152	153,5	160	158,5	161	162	173
	19	20	21	22	23	24				
237,5	224,5	236	239,5	239,5						
233,5	221,5	225	240,5	237,5						
240,5	236	242	241,5	242						
222,5	221	221	222	223,5						
181,5	180	179	179	180,5	182					
172	167,5	175	175	180,5	185					

- Konversi dosis manusia dengan berat badan 70 kg dan tikus 20 gram sebesar 0,018  

$$\frac{1 \text{ gram}}{\text{hari}} \times 0,018 = 0,018 \text{ gram/hari}$$
 dalam 200 gram tikus.jadi dalam 1kg BB  
 0,09 gram
- Jumlah kalsium yang disondekan pada tikus:  
 1 gram BB yang disonde sebesar 0,01 mL

Untuk 200 gram BB yang disonde sebesar =  $200 \times 0,01 \text{ mL} = 200 \text{ mL}$ , karena jumlah yang disonde disesuaikan dengan berat badan dari tikus.

- Volume sediaan yang dibuat:

$6 \text{ ekor} \times 200 \text{ gram} \times 0,01 \text{ mL} \times 7 \text{ hari} \times 1 = 84 \text{ mL}$  digenapkan menjadi 100 mL.

Jadi jumlah kalsium yang dibutuhkan, untuk 2 ml setara dengan 0,018 gram, untuk 100 mL:

$$\frac{100 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times 0,018 \text{ gram} = 0,9 \text{ gram kalsium}$$

## B. Data Berat Tulang Femur Sebelum dan Sesudah Difurnace

### B.1 berat tulang femur tidak diberi asupan kalsium

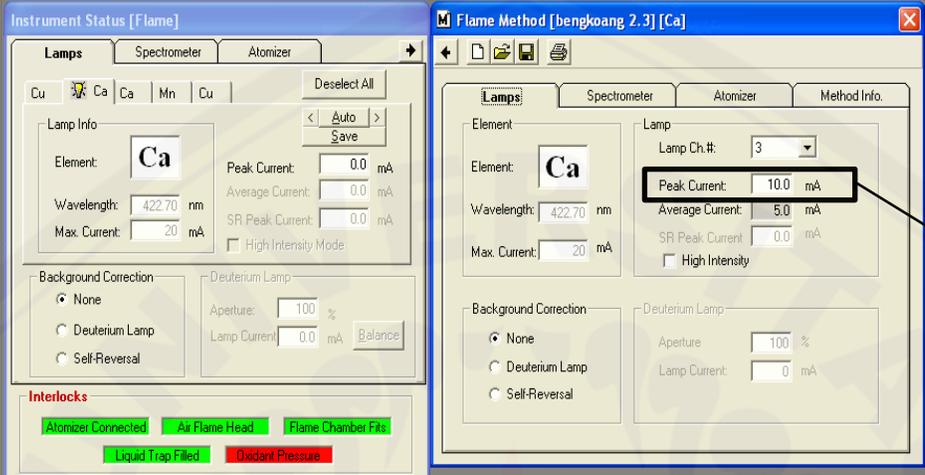
Sebelum (gram)	Sesudah (gram)
0,693	0,404
0,738	0,422
0,801	0,483
0,791	0,474
0,738	0,394
0,726	0,380

### B.2 Berat tulang femur diberi asupan kalsium

Sebelum (gram)	Sesudah (gram)
0,788	0,465
0,737	0,387
0,793	0,420
0,509	0,324
0,788	0,472

## C. Data Optimasi Laju Alir, Lebar Celah dan Laju Asetilen

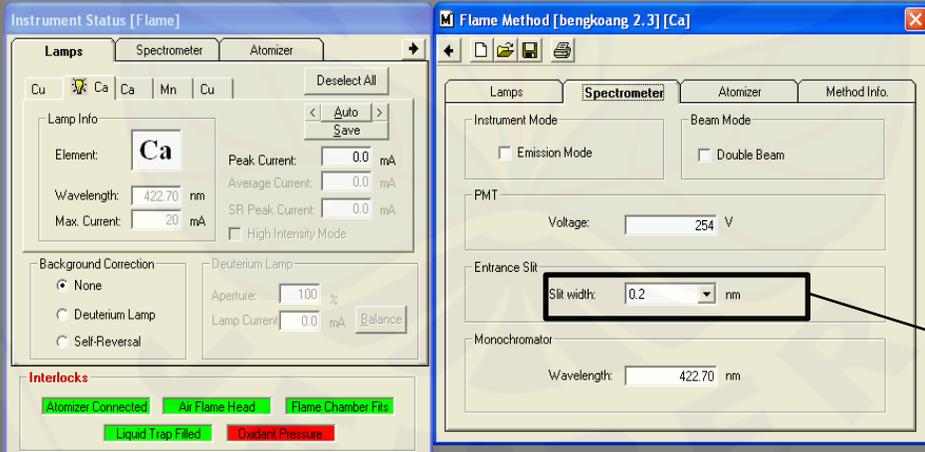
### C.1 Optimasi laju alir



The screenshot displays two windows from the instrument software. The left window, 'Instrument Status [Flame]', shows the 'Lamps' section with 'Ca' selected. The right window, 'Flame Method [bengkoang 2.3] [Ca]', shows the 'Lamps' section with 'Ca' selected and 'Peak Current' set to 10.0 mA. A callout box points to the 'Peak Current' value with the text 'Optimasi Arus Lampu'.

Laju alir yang terpilih hasil optimasi adalah 10 mA.

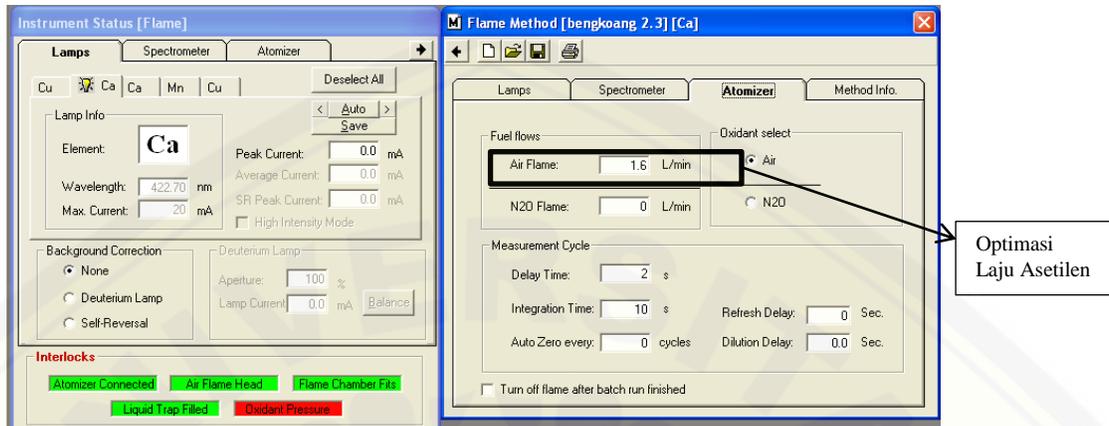
### C.2 Optimasi lebar celah



The screenshot displays two windows from the instrument software. The left window, 'Instrument Status [Flame]', shows the 'Lamps' section with 'Ca' selected. The right window, 'Flame Method [bengkoang 2.3] [Ca]', shows the 'Spectrometer' section with 'Slit width' set to 0.2 nm. A callout box points to the 'Slit width' value with the text 'Optimasi Lebar Celah'.

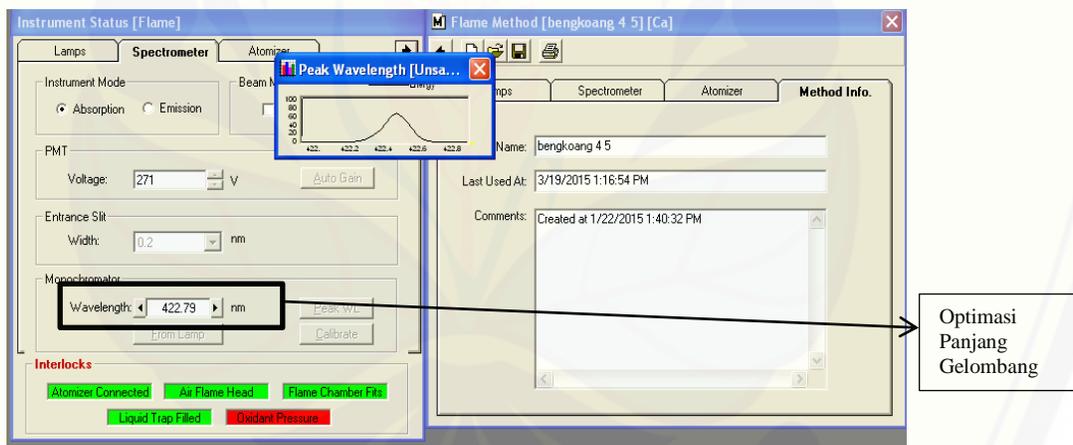
Lebar celah yang terpilih hasil optimasi adalah 0,2 nm.

## C.3 Optimasi laju asetilen



Laju asetilen yang terpilih hasil optimasi adalah 1,6 L/menit.

## D. Data Optimasi Panjang Gelombang



Panjang gelombang yang terpilih hasil optimasi adalah 422,79 nm.

**E. Data Optimasi Konsentrasi Uji**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (ppm)
0,1	0.02523
0,6	0.04467
4	0.14110
8	0.25610
10	0.29750

**F. Data Linieritas**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (ppm)
5,005	0.1558
10,00	0,2706
15,02	0,3627
20,00	0,4726
25,03	0,5621
30,00	0,6264
Persamaan regresi linier	$Y = 0,07463 + 0,01906 X$ $r = 0,99679$

Method : Linearity

Probability : 95%

Number of Data : 6

Line Equation :  $0,07463 + 0,01906 X$

Corelation coefficient : 0,99679

Sy value : 0.016019

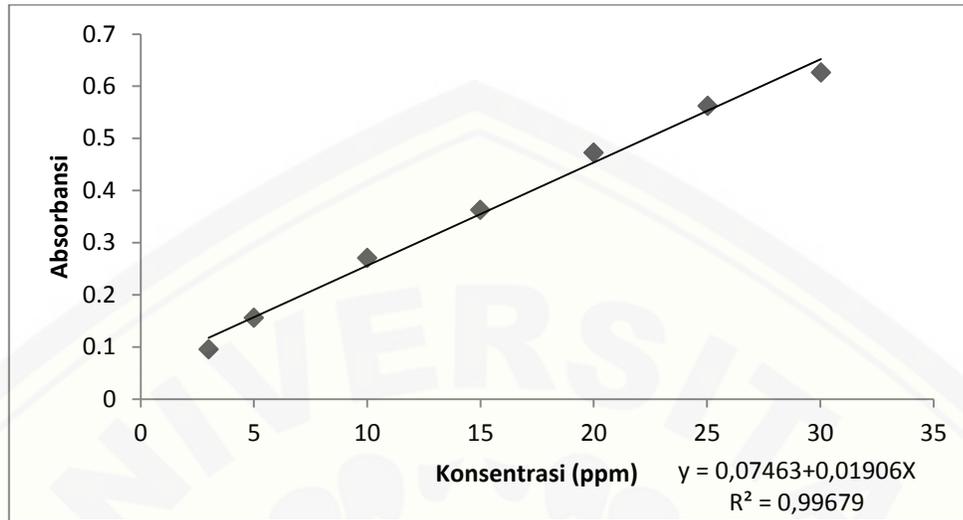
Vx0 value : 4,7998%

Xp value : 4.6502

The Corelation coefficient is fulfilled the requirement ( > 0,99 )

The Vx0 value is fulfilled the requirement ( 0% to 5% )

The Xp value is OK ( < 5.00500000 )



### G. Data Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

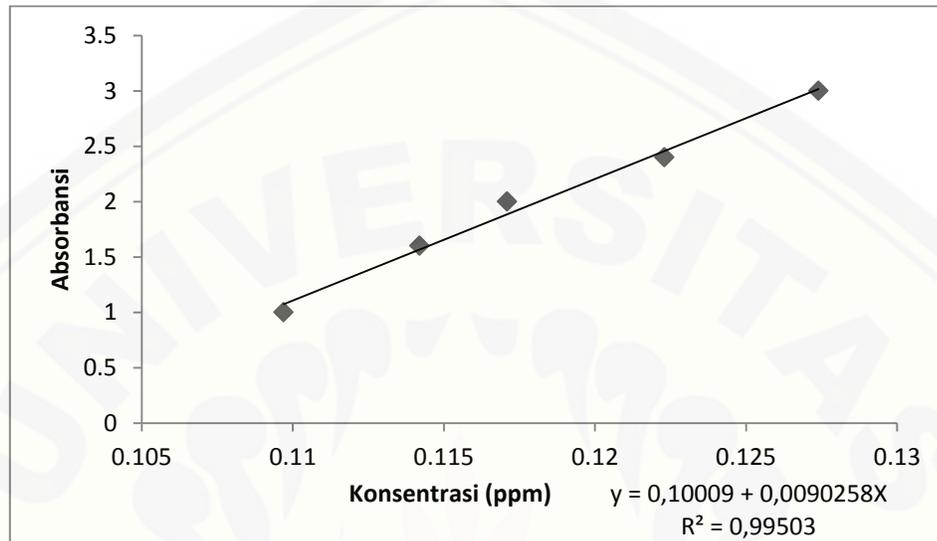
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (ppm)
1	0,1097
1,6	0,1142
2	0,1171
2,4	0,1223
3	0,1274
Persamaan regresi linier	$Y = 0.10009 + 0.0090258 X$
$r > 0,99$	$r = 0,99503$
$V_{x0} < 5\%$	$V_{x0} = 4,3975\%$
$X_p < 0.1097$ (1 ppm)	$X_p = 0,6369$

Method : Linearity  
 Probability : 95%  
 Number of Data : 5  
 Line Equation :  $0.10009 + 0.0090258 X$   
 Corelation coefficient : 0,99503  
 Sy value : 0.0007938  
 Vx0 value : 4,3975%  
 Xp value : 0,6369

The Corelation coefficient is fulfilled the requirement ( $> 0,99$ )

The  $V_{x0}$  value is fulfilled the requirement ( 0% to 5%)

The  $X_p$  value is OK ( $< 1,00000000$ )



Method : DL – QL  
 Number of data : 5  
 DL value : 0,63690260 ppm  
 QL value : 1,91070800 ppm

## H. Data Presisi

### H.1 Hasil uji presisi hari ke-1 kalsium

Penimbangan (mg)	Massa Hasil percobaan (mg)	Kadar b/b
25,0	4,82	19,3%
25,1	4,91	19,5%
25,1	4,95	19,7%
25,0	4,91	19,6%
25,0	4,97	19,9%
25,0	4,74	18,9%
	Rata-rata	19,5%
	RSD/CV	1,72%

## H.2 Hasil uji presisi hari ke-2 kalsium

Penimbangan (mg)	Massa Hasil percobaan (mg)	Kadar b/b
25,0	4,95	19,8%
25,1	4,92	19,6%
25,0	4,92	19,7%
25,0	4,92	19,7%
25,1	4,79	19,1%
25,0	4,98	19,9%
	Rata-rata	19,6%
	RSD/CV	1,98%

## H.3 Hasil uji presisi hari ke-3 kalsium

Penimbangan (mg)	Massa Hasil percobaan (mg)	Kadar b/b
25,0	4,70	18,8%
25,0	4,93	19,7%
25,0	4,94	19,7%
25,0	4,92	19,7%
25,1	4,96	19,7%
25,1	4,93	19,6%
	Rata-rata	19,5%
	RSD/CV	1,89%

Perhitungan kadar kalsium dari uji presisi yaitu sebagai berikut.

Misal: hari ke-1 replikasi 1: konsentrasi analit (ppm) =

$$\frac{19,3163\mu\text{g}}{1\text{mL}} = 19,3163\mu\text{g}$$

Jumlah analit dalam larutan sampel adalah 50 mL, jika dipipet 10 mL dilarutkan ke dalam 50 mL =

$$965,815 \mu\text{g} \times 50 \text{ mL} \times \frac{50\text{mL}}{10\text{mL}} = 4829,075 \mu\text{g} = 4,829 \text{ mg}$$

Kadar kalsium dalam sampel yang ditimbang =

$$\frac{4,82 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} \times 100\% = 19,3\%$$

H.4 Hasil Uji Presisi *Intermediate Precision* (Data uji presisi selama 3 hari percobaan dengan n=6)

Hari Ke-	Kadar b/b	RSD (n=6)
1	19,5%	1,72%
2	19,6%	1,98%
3	19,5%	1,90%
Rata-rata RSD/CV		1,86%

### I. Data Akurasi

Perhitungan sampel uji akurasi dengan metode standar adisi.

Kadar inulin hasil presisi (rata-rata kadar inulin dari hasil uji presisi hari ke-1) yaitu 19,5251%.

#### 1. Adisi 30%

- Bila ditimbang sampel 25 mg, maka jumlah standar kalsium yang ditambahkan dalam sampel sebesar:
  - $\frac{25 \text{ mg sampel} \times 19,5251 \text{ g} \times 0,3}{100 \text{ g}} = 11,71 \text{ mg}$  standar kalsium
- Diketahui Ar Ca adalah 40,08, dan Mr CaCO<sub>3</sub> adalah 100,09. Jika ditimbang kalsium sebesar 11,71 mg maka CaCO<sub>3</sub> sebesar 29,24 Mg CaCO<sub>3</sub>
- Total bobot sampel + standar = 200 mg + 29,24 mg = 229,24 mg.
- Konsentrasi teoritis =  $\frac{25 \text{ mg}}{229,24 \text{ mg}} \times 11,71 \text{ mg} = 1,277 \text{ mg}$  (jumlah kalsium dalam sampel)
- Penimbangan sampel adisi = 25 mg (sama dengan uji presisi)

Misal : replikasi 1 = penimbangan sampel adisi 25 mg.

Jika ditimbang sampel sebesar 200 mg, maka jumlah Ca dalam sampel adalah sebagai berikut:

$$\frac{19,5251 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 200 \text{ mg} = 0,039 \text{ mg dalam } 200 \text{ mg sampel}$$

Jumlah Ca dalam sampel sebesar

$$\frac{25 \text{ mg}}{229,24 \text{ mg}} \times 39 \text{ mg} = 4,258 \text{ mg}$$

Hasil percobaan yang diperoleh sebesar 22,1197 ppm, maka:

$$\frac{22,1197 \mu\text{g}}{\text{mL}} \times 50 \text{ mL} = 1105,99 \mu\text{g}$$

$$\frac{1105,99 \mu\text{g}}{10 \text{ mL}} \times 50 \text{ mL} = 5,530 \text{ mg}$$

Maka Ca dalam sampel sebesar  $5,530 \text{ mg} - 4,258 \text{ mg} = 1,272 \text{ mg}$

## 2. Adisi 45%

- Bila ditimbang sampel 25 mg, maka jumlah standar kalsium yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

- $\frac{25 \text{ mg sampel} \times 19,5251 \text{ g} \times 0,45}{100 \text{ g}} = 17,57 \text{ mg standar kalsium}$

- Diketahui Ar Ca adalah 40,08, dan Mr CaCO<sub>3</sub> adalah 100,09. Jika ditimbang kalsium sebesar 17,57 mg maka CaCO<sub>3</sub> sebesar 43,88 mg CaCO<sub>3</sub>

- Total bobot sampel + standar = 200 mg + 43,88 mg = 243,88 mg.

- Konsentrasi teoritis =  $\frac{25 \text{ mg}}{243,88 \text{ mg}} \times 17,57 \text{ mg} = 1,801 \text{ mg}$  (jumlah kalsium dalam sampel)

- Penimbangan sampel adisi = 25 mg (sama dengan uji presisi)

Misal : replikasi 1 = penimbangan sampel adisi 25 mg.

Jika ditimbang sampel sebesar 200 mg, maka jumlah Ca dalam sampel adalah sebagai berikut:

$$\frac{19,5251 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 200 \text{ mg} = 0,03905 \text{ mg dalam } 200 \text{ mg sampel}$$

Jumlah Ca dalam sampel sebesar

$$\frac{25 \text{ mg}}{243,88 \text{ mg}} \times 39,05 \text{ mg} = 4,003 \text{ mg}$$

Hasil percobaan yang diperoleh sebesar 23,2088 ppm, maka:

$$\frac{23,2088 \text{ } \mu\text{g}}{\text{mL}} \times 50 \text{ mL} = 1160,44 \text{ } \mu\text{g}$$

$$\frac{1160,44 \text{ } \mu\text{g}}{10 \text{ mL}} \times 50 \text{ mL} = 5,800 \text{ mg}$$

$$\text{Maka Ca dalam sampel sebesar } 5,800 \text{ mg} - 4,003 \text{ mg} = 1,797 \text{ mg}$$

### 3. Adisi 60%

- Bila ditimbang sampel 25 mg, maka jumlah standar kalsium yang ditambahkan dalam sampel sebesar:

$$\bullet \frac{25 \text{ mg sampel} \times 19,5251 \text{ g} \times 0,6}{100 \text{ g}} = 23,43 \text{ mg standar kalsium}$$

- Diketahui Ar Ca adalah 40,08, dan Mr CaCO<sub>3</sub> adalah 100,09. Jika ditimbang kalsium sebesar 23,43 mg maka CaCO<sub>3</sub> sebesar 58,51 Mg CaCO<sub>3</sub>

- Total bobot sampel + standar = 200 mg + 58,51 mg = 258,51mg.

- Konsentrasi teoritis =  $\frac{25 \text{ mg}}{258,51 \text{ mg}} \times 23,43 \text{ mg} = 2,266 \text{ mg}$  (jumlah kalsium dalam sampel)

- Penimbangan sampel adisi = 25 mg (sama dengan uji presisi)

Misal : replikasi 1 = penimbangan sampel adisi 25 mg.

Jika ditimbang sampel sebesar 200 mg, maka jumlah Ca dalam sampel adalah sebagai berikut:

$$\frac{19,5251 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 200 \text{ mg} = 0,03905 \text{ mg dalam } 200 \text{ mg sampel}$$

Jumlah Ca dalam sampel sebesar

$$\frac{25 \text{ mg}}{258,51 \text{ mg}} \times 39,05 \text{ mg} = 3,776 \text{ mg}$$

Hasil percobaan yang diperoleh sebesar 24,0999 ppm, maka:

$$\frac{24,0999 \mu g}{mL} \times 50 mL = 1204,99 \mu g$$

$$\frac{1204,99 \mu g}{10 mL} \times 50 mL = 6,025 mg$$

Maka Ca dalam sampel sebesar  $6,025 mg - 3,776 mg = 2,249 mg$

#### Hasil Uji Akurasi Kalsium

Penambahan Standar	Penimbangan Sampel Adisi (mg)	Massa Kalsium Teoritis (mg)	Massa Kalsium Hasil Percobaan (mg)	Recovery (%)	RSD (%)
30%	25,0	1,277	1,272	99,608	0,391
	25,0	1,277	1,282	100,391	
	25,0	1,277	1,277	100	
45%	25,0	1,801	1,797	99,778	1,967
	25,0	1,801	1,862	103,387	
	25,0	1,801	1,857	103,109	
60%	25,0	2,266	2,249	99,250	0,885
	25,0	2,266	2,264	100	
	25,0	2,266	2,289	101,015	
Rata-rata					1,081%

Method : Accuracy  
 Probability : 95%  
 Number of data : 9  
 Line equation :  $X_f = 0,0795390 + 1,00283300X_c$   
 VBaf value :  $0,00795390 \pm 0,10617990$   
 VBbf value :  $1,00283300 \pm 0,05813072$   
 Average %R :  $100,71680000\% \pm 1,51958200$

The average %R value is fulfilled the requirement (98 to 102%)

The VBaf value is fulfilled the requirement (-0,09822598 to 0,11413380)

The VBbf value is fulfilled the requirement (0,94470200 to 1,06096400)

**J. Data Penetapan Kadar Kalsium pada Tulang Femur Tikus****J.1 Hasil Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus yang Tidak Diberi Asupan Kalsium**

Penimbangan (mg)	Massa.Hasil Percobaan (mg)	Kadar (%)
25,0	3,98	15,9
25,0	3,97	15,9
25,0	3,98	15,9
25,0	3,98	15,9
25,0	4,00	16,0
25,0	3,87	15,5
Rata-rata		15,8
SD/CV		1,14

**J.2 Hasil Penetapan Kadar Kalsium dalam Tulang Femur Tikus yang Diberi Asupan Kalsium**

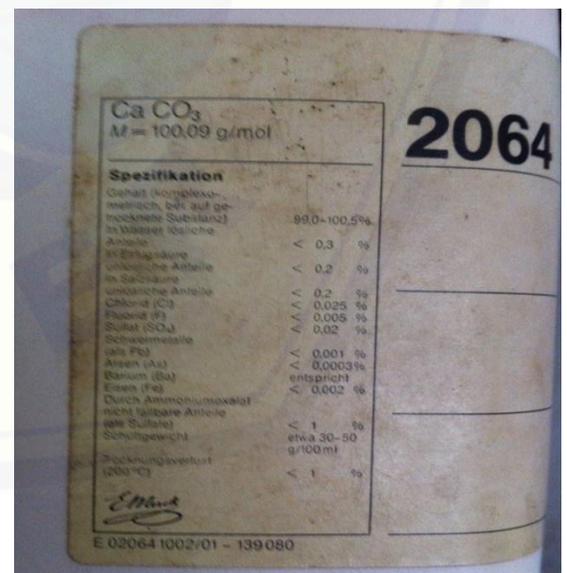
Penimbangan (mg)	Massa.Hasil Percobaan (mg)	Kadar (%)
25,0	4,51	18,0
25,0	4,51	18,0
25,0	4,43	17,7
25,0	4,31	17,2
25,0	4,50	18,0
25,0	4,42	17,7
Rata-rata		17,8
SD/CV		1,80

**K. Foto Perlakuan dan Pembedahan**

**K.1 Foto penyondean tikus dengan kalsium laktat**



**K.2 Foto label dari kalsium laktat dan Kalsium Karbonat**



K.3 Foto proses pengambilan tulang



K.4 Foto tulang sebelum dan setelah di *furnace*

