PENETAPAN KADAR TOTAL ARSENIK DALAM MAKANAN PENDAMPING AIR SUSU IBU DENGAN INSTRUMEN AAS-HVG: VERIFIKASI METODE DAN PERBANDINGAN PROGRAM MICROWAVE

Determination of Total Arsenic in Complementary Food by HVG-AAS: Method Verification and Comparison of Microwave Program

Suyanto^{1,2}, Hanifah Nuryani Lioe^{1*}, Puspo Edi Giriwono^{1,3}, Dedi Fardiaz^{1,3}

¹Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan – Fakultas Teknologi Pertanian – IPB
Kampus Darmaga – Bogor 16680

²Badan Pengawas Obat dan Makanan RI (Indonesian FDA)
Jalan Percetakan Negara No. 23 – Jakarta 10560

³South East Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center – IPB
Kampus Darmaga – Bogor 16680

*Penulis Korespondensi, email: hanifahlio@apps.ipb.ac.id

Disubmit : 08 April 2021

Direvisi : 20 Juli 2021

Diterima : 19 Agustus 2021

ABSTRAK

Pemilihan program digesti sampel dengan *microwave* penting dilakukan untuk memperoleh hasil destruksi yang sempurna. Kesempurnaan destruksi sampel menentukan keberterimaan parameter verifikasi metode yaitu akurasi, presisi, linearitas dan sensitivitas. Penelitian ini bertujuan untuk memilih metode destruksi *microwave* dalam penetapan total arsenik dalam MP-ASI menggunakan AAS-HVG. Evaluasi dilakukan terhadap parameter verifikasi metode dan perbandingan dua program *microwave* dilakukan dengan uji t. Hasil penelitian menunjukkan bahwa program destruksi *microwave* pertama (P1) lebih baik daripada program *microwave* pembanding (P2) yang menghasilkan rata-rata *recovery* 84,79% hingga 104,57% untuk sampel bermatriks makanan dan 64,43% untuk sampel air. Presisi metode terpilih menghasilkan rata-rata RSD 6,63% hingga 13,41% untuk sampel bermatriks dan 4,66% untuk sampel air. Linearitas metode pada program terpilih menunjukkan R:0,997 dengan koefisien variasi regresi $Vx0:4,24\%$, sedangkan batas deteksi dan batas kuantifikasi sebagai parameter sensitivitas berturut-turut 0,04 ng/g dan 0,12 ng/g untuk sampel bermatriks serta 0,01 ng/ml dan 0,02 ng/ml untuk sampel air. Metode penetapan kadar total arsenik dengan program *microwave* terpilih memenuhi syarat keberterimaan menurut uji verifikasi metode

Kata kunci: Arsenik; Digesti; *Microwave*; Makanan Pendamping Asi; Verifikasi Metode

ABSTRACT

It is important to choose a sample digestion program with *microwave* to obtain the best digestion results. The sample digestion may determine the acceptability of the method verification parameters, namely accuracy, precision, linearity and sensitivity. The aim of this study was to select a *microwave* digestion method in determining the total arsenic in complementary foods using HVG-AAS. The evaluation was carried out on the parameter verification method and the comparison of the two *microwave* programs was carried out using the t test. The results showed that the first *microwave* digestion program (P1) was better than the comparator *microwave* program (P2) which resulted in an average *recovery* of 84.79% to 104.57% for matrix samples and 64.43% for water samples. The precision of the selected method resulted in an average RSD of 6.63% to 13.41% for food matrix samples and 4.66% for water samples. The linearity of the method in the selected program shows R: 0.997 with a regression coefficient of variation $Vx0: 4.24\%$, while the limit of detection and limit of quantification as

sensitivity parameters are 0.04 ng/g and 0.12 ng/g for matrix samples respectively 0.01 ng/ml and 0.02 ng/ml for water samples. The method for determining the total arsenic concentration using the selected microwave program met the acceptability requirements according to the method verification test.

Keywords : Arsenic, Digestion, Microwave, Complementary Food, Method Verification

PENDAHULUAN

Tahap analisis arsenik dalam sampel terdiri dari preparasi sampel hingga diperoleh larutan analitik dan penentuan arsenik dengan instrumen. Preparasi sampel harus dilakukan dengan baik, karena tahap ini merupakan salah satu tahapan kritis dalam keseluruhan rangkaian pengujian arsenik (Welna *et al.*, 2015). Preparasi sampel bertujuan untuk meniadakan atau mengurangi gangguan saat pengukuran analit, minimalisasi kontaminasi, ketertelusuran hasil dengan melibatkan jumlah sampel, reagen, waktu dan limbah sekecil mungkin (de Oliveira, 2003). Sebagai contoh, perubahan aliran elektroosmotik dalam kapiler karena matriks sampel dapat menyebabkan gangguan dalam pengukuran analit. Gangguan dapat juga berasal dari sisa karbon yang tinggi karena digesti belum sempurna (Müller *et al.*, 2014). Demikian juga *baseline* detektor dapat terganggu jika pH sampel berbeda dengan pH larutan blanko. Perlu dilakukan strategi untuk melakukan ekstraksi, pemekatan atau pra-konsentrasi, dan derivatisasi sampel sebelum pengukuran menggunakan instrumen (Gómez-Ariza *et al.*, 2001).

Microwave dengan sistem vesel tertutup merupakan cara digesti sampel yang digunakan untuk analisis kuantitatif total As maupun spesies arsenik (Alava *et al.*, 2012). Gelombang mikro sering digunakan untuk mengekstraksi matriks biologis dan lingkungan, jauh lebih cepat daripada prosedur ekstraksi Soxhlet. Parameter seperti daya gelombang mikro yang diterapkan dan waktu paparan atau suhu dan waktu paparan harus dioptimalkan untuk kesempurnaan hasil digesti (de Oliveira, 2003). Penggunaan *microwave* untuk ekstraksi sampel disertai dengan penggunaan pelarut asam encer atau pelarut organik dengan kombinasi suhu. Raber *et al.* (2012) melaporkan bahwa ekstraksi menggunakan gelombang *microwave*, dapat digunakan untuk penentuan arsenik dalam makanan. Digesti matriks

sampel secara *microwave* menyebabkan unsur logam arsenik lepas dari matriks organiknya. Matriks organik terurai menjadi unsur-unsur karbon, hidrogen, dan oksigen. Matriks tersebut selanjutnya tidak mengganggu dalam pengukuran. Pada umumnya digesti *microwave* dilakukan dengan pelarut asam kuat dengan program *microwave* tertentu tergantung dari jenis matriks organiknya (de Oliveira, 2003).

Tujuan dari penggunaan *microwave* untuk memperoleh hasil digesti sempurna sehingga diperoleh larutan analit logam secara valid, dekomposisi matriks secara sempurna, terhindar dari hilangnya analit serta kontaminasi dan kemudahan penanganan termasuk penghematan waktu (de Oliveira, 2003). Pada digesti sampel organik digunakan pelarut asam, suhu dan tekanan *microwave* yang optimal yaitu berkisar 300 °C dan 200 bar (Müller *et al.*, 2014). Asam nitrat pekat merupakan asam yang biasa digunakan untuk digesti pada banyak macam sampel. Gelombang *microwave* berinteraksi dengan nitrat, menghasilkan HNO₃ panas yang merupakan agen oksidator kuat untuk *men-digest* sampel organik sehingga banyak analit logam menjadi larut setelah digesti selesai (Müller *et al.*, 2014). Dekomposisi matriks organik menjadi senyawa anorganik, seperti CO₂, NO dan H₂O. Makanan penamping air susu ibu (MP-ASI) merupakan sampel pangan bermatriks kompleks yang memerlukan program digesti *microwave* yang tepat agar diperoleh hasil digesti yang sempurna.

Pengembangan prosedur atau program digesti secara *microwave* merupakan langkah penting sebelum sampel dianalisis dengan instrumen *atomic absorption spectrometer-hydride vapour generator* (AAS-HVG). Beberapa parameter yang berhubungan dengan matriks sampel, jenis analit logam, dan teknik penetapan harus dipertimbangkan untuk memperoleh

hasil yang reliabel serta keamanan selama dekomposisi. Reagen yang digunakan juga memiliki interaksi dengan analit, oleh karena itu reagen pun perlu dipilih yang tidak membentuk senyawa yang mudah menguap atau berikatan kuat dengan analit (Müller *et al.*, 2014). Sampel pangan dan matriks biologi lainnya disusun oleh tiga kelompok utama yaitu karbohidrat, protein dan lemak. Oksidasi karbohidrat dengan asam nitrat pada umumnya lebih cepat daripada oksidasi protein dan lemak (Müller *et al.*, 2014). Jumlah sampel pangan yang didigesti maksimum 5 g dengan asam nitrat pekat 8 ml dan hidrogen peroksida 1 ml, secara *microwave* CEM dengan tekanan 50 bar pada suhu 200 °C (Müller *et al.*, 2014), tetapi menurut de Oliveira (2003) berat sampel bisa sampai 10 g. Secara umum berat sampel untuk digesti *microwave* sebesar 0,2 sampai 1 g dengan maksimum suhu 180 hingga 200 °C dan waktu kurang dari 30 menit. Tetapi bagaimanapun tetap tergantung dari sistem dan kondisi *microwave*, serta kandungan asam lemaknya (Würfels *et al.*, 1989).

Verifikasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan sesuai penggunaannya (ISO/IEC 17025:2017, 2017). Parameter utama verifikasi metode meliputi kecermatan, keseksamaan, linearitas, dan batas deteksi. Kecermatan atau akurasi adalah ukuran derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Keseksamaan atau presisi adalah ukuran derajat kesesuaian antara hasil uji individual terhadap sebaran hasil individual yang diterapkan secara berulang. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif. Ia dinyatakan juga sebagai keterulangan (*repeatability/reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Linearitas merupakan rentang standar dengan jarak konsentrasi tertentu dengan respon yang membentuk garis lurus menurut titik-titik yang dibentuk. Linearitas, adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung dan proporsional terhadap konsentrasi analit. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah sampai batas tertinggi analit yang

sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Batas deteksi dan kuantifikasi, adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan parameter diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria kecermatan dan keseksamaan (AOAC, 2016). Parameter tersebut merupakan titik kritis dalam penetapan kadar arsenik, oleh karena harus dilakukan dengan tepat (Welna *et al.*, 2015).

Apabila sebuah laboratorium menggunakan metode standar yang telah dipublikasi, laboratorium yang bersangkutan harus memverifikasi, walaupun hanya pada aspek-aspek tertentu. Hal ini dimaksudkan agar laboratorium tersebut memiliki data objektif unjuk kerja dan memastikan bahwa metode sesuai penggunaannya, mengingat masing-masing laboratorium memiliki kondisi berbeda, serta akomodasi, lingkungan, kompetensi personil, dan kinerja peralatan yang berbeda (ISO/IEC 17025:2017, 2017). Aspek pengujian tersebut antara lain akurasi, presisi, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi (AOAC, 2016).

Banyak tersedia program digesti secara *microwave*, pada umumnya tersedia dalam manual penggunaan alat dan juga pada jurnal penetapan kadar total arsenik. Program tersebut harus dipilih yang terbaik, disesuaikan dengan matriks sampel pangan yang diuji. Evaluasi program digesti perlu dilakukan dengan parameter uji verifikasi, dimaksudkan untuk mengetahui kinerja metode. Perbandingan program digesti *microwave* secara manual alat yang dilaporkan CEM dan yang dilakukan oleh Narukawa *et al.* (2014) diteliti dalam penelitian ini untuk mengetahui metode terbaik dengan kinerja metode yang diterima.

METODE

Alat yang digunakan pada penelitian antara lain alat gelas, hot plate (Molleb KG), *microwave* digester MARS X-Press (CEM Corporation, USA), seperangkat alat

AAS (Agilent AA280FS/VGA, USA) (*Atomic Absorption Spectrophotometry*) yang dilengkapi dengan unit HVG (*Hydride Vapor Generator*) (Agilent AA280FS/VGA, USA).

Bahan kimia yang digunakan adalah air ultra murni 18.2 M Ω cm dari Milli-Q® Merck (Jerman) untuk analisis, asam nitrat (65% Suprapur®), asam hidroklorida (fuming 37% Emsure®), hydrogen peroksida (30% Emsure®), sodium hidroksida (pellet Emsure®), asam L-askorbat (Emsure®), sodium borohidrida (pro analysis) dan potassium iodide (pro analysis Emsure®), magnesium nitrat heksahidrat (pro analysis Emsure®) dan stok larutan standar (SRM As V 1000 mg/L, Certipur tertelusur ke SRM NIST (dalam HNO₃ 2-3%). Semua bahan kimia berasal dari Merck KGaA (Darmstadt, Jerman).

Sampel uji menggunakan empat macam kelompok MP-ASI, yaitu bubur siap saji non-registrasi (SPL 01-K), makanan selingan siap saji (SPL 05-K), air minum galon isi ulang (SPL 17-KT), minuman lain bermatriks (SPL 20-K). Masing-masing sampel merupakan sampel komposit homogen yang berisi dari beberapa produk yang dikonsumsi anak. Sampel komposit dibuat dari serangkaian survei konsumsi yang tidak disampaikan dalam paper ini.

Preparasi Sampel

Preparasi sampel meliputi preparasi sampel makanan dan homogenisasinya, serta preparasi larutan analitik yang dimulai dari digesti sampel makanan dengan penamabahan asam kuat dan pemanasan dalam *microwave oven* hingga diperoleh larutan sampel analitik. Terhadap alat-alat gelas, vessel *microwave* dan wadah yang terlibat dilakukan pencucian dengan cara direndam menggunakan larutan asam nitrat 10% (v/v) semalam, kemudian dibilas menggunakan air 18 M Ω cm dan dikeringkan (AOAC, 2005).

Sampel yang dipreparasi berupa makanan pendamping ASI, yang diperoleh dengan cara mencampur secara proporsional sesuai jumlah yang dikonsumsi anak. Sampel komposit tersebut selanjutnya dihomogenisasi menggunakan blender sampai homogen (Otles dan Ozyurt, 2015). Sejumlah sampel homogen ditimbang secara saksama $\pm$ 0,2-2,5 g komposit sampel yang telah dihomogenisasi, dimasukkan ke dalam vessel PTFE diikuti oleh 5 ml HNO₃ (65%) dan 1 ml H₂O₂ (30%)

(AOAC, 2005). Sampel didestruksi dengan *microwave oven* dengan aplikasi program (2.1.1) yang diteliti, untuk 18 vessel. Sampel didinginkan dan kemudian ditara ke dalam labu tentukur volume 25 ml dengan air ultra murni 18,2 M Ω cm. Aliquot larutan 10 ml dituangkan ke dalam krus porselen dan dicampur dengan 2 ml 7% Mg(NO₃)₂. Sampel kemudian diuapkan di atas *hotplate* hingga kering. Selanjutnya krus dipanaskan dalam *muffle furnace* dengan suhu 450 °C selama 1 jam. Setelah didinginkan hingga suhu kamar, dituangkan 2 ml HCl 6 M, diaduk dan larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 ml, krus dibilas dua kali, bilasan dituang ke labu yang sama dan kemudian ditara hingga volume akhir 10 ml dengan air ultra murni. Aliquot 5,0 ml dari larutan ini kemudian dicampur dengan 5,6 ml larutan reduksi (30 mM KI; 28 mM L-0,1% asam askorbat; dan 3 M HCl) dan dibiarkan bereaksi selama 60 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, 4,8 ml HCl 3 M ditambahkan dan dibiarkan bereaksi selama 60 menit lagi pada suhu kamar sebelum pengukuran AAS-HVG (Saxena *et al.*, 2017).

Program *Microwave* untuk Digesti Sampel

Program *microwave* merupakan serangkaian program yang digunakan untuk mendigesti matriks sampel sampai siap diukur secara AAS-HVG. Program *microwave* berikut merupakan program yang akan dibandingkan untuk dipilih yang terbaik. Dua program yang dievaluasi adalah program *microwave* yang disediakan oleh manual alat MARS X-Press CEM (program *microwave* pertama atau P1) dan program *microwave* yang dilakukan Narukawa *et al.* (2014) (program *microwave* pembanding atau P2).

Program *microwave* pertama (P1)

Program pertama (P1) adalah program dari manual alat MARS X-Press (CEM Corporation, USA) dengan program digesti untuk 18 vessel, yaitu *First stage*: Power = 800 W, 100%; Ramp time (min) = 2; 120 °C, Hold Time (min) = 5 min; *Second stage*: Power = 800 W, 100%; Ramp time (min) = 5, 150 °C; Hold Time (min) = 10 min; *Third stage*: Power = 800 W, 100%; Ramp time (min) = 5, 200 °C; Hold Time (min) = 30 min.

Program microwave pembeding (P2)

Program pembeding (P2) adalah program *microwave* yang dilakukan Narukawa *et al.* (2014), yaitu *First stage: Power* = 200 W, 100%; *Hold Time* (min)=5 min; *Second stage: Power* = 300 W, 100%; *Hold Time* (min)=5 min; *Third stage: Power* = 500 W, 100%; *Hold Time* (min) = 10 min; *Fourth stage: Power* = 600 W, 100%; *Hold Time* (min) = 5 min.

Pembuatan Kurva Standar

Pembuatan larutan intermediet As^V 1,0 µg/ml dengan cara dipipet 1,0 ml larutan standar arsenik (H₃AsO₄) 1000 µg/ml, selanjutnya dimasukkan ke dalam labu 100 mL dan ditepatkan sampai tanda menggunakan air 18 MΩcm.

Pembuatan larutan intermediet As^V 100 ng/ml dengan cara dipipet 10,0 ml larutan intermediet 1,0 µg/ml dimasukkan ke labu 100 ml. Selanjutnya ditambahkan 10 ml asam nitrat 0,15 mol/l menggunakan pipet volum, diencerkan hingga tanda menggunakan air 18 MΩcm.

Pembuatan larutan standar kerja level 0,1; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5; 10 ng/ml sebagai arsenik (Calle *et al.*, 2017), berturut-turut dengan cara dipipet 50, 150, 300, 625, 1250, 2500, 5000 µl dari larutan standar intermediet As^V 100 ng/ml, dimasukkan ke labu 50 ml. Selanjutnya ke dalam masing-masing labu ditambahkan 5,6 ml larutan reduksi (KI-asam askorbat-HCl) dan didiamkan 1 jam. Setelah itu, campuran ditambahkan 4,8 ml HCl 3M dan didiamkan 1 jam, kemudian ditepatkan hingga 50 ml menggunakan air 18 MΩcm (Saxena *et al.*, 2017).

Pengukuran t-As dengan Instrumen AAS-HVG

Prosedur penetapan kadar arsen total (t-As) meliputi preparasi sampel dan pengukuran analit (Saxena *et al.*, 2017). Larutan kerja hasil preparasi sampel selanjutnya ditetapkan kadar t-As-nya dengan kondisi AAS-HVG yaitu *air flow*: 13,5 l/min, *acetylene flow*: 2,10 l/min, *wavelength*: 193,7 nm, dan *slit width* 0,5R nm. Gas pembawa digunakan argon dengan kualitas *ultrahigh-purity* (99,998%). Gas bahan bakar digunakan acetylene kualitas *high-purity* (99,5%) dan udara yang disaring dan diambil melalui kompresor. Reduksi arsenik valensi V dilakukan dengan sodium borohydride (0,6%) dan sodium

hidroksida (0,5%) dalam suasana asam (Nugraha *et al.*, 2017).

Verifikasi

Verifikasi metode dilakukan terhadap beberapa matriks sampel yang mewakili komposit MP-ASI. Beberapa komposit MP-ASI yang dijadikan wakil uji verifikasi metode adalah bubur siap saji non registrasi (01-K), makanan selingan siap saji (05-K), air minum isi ulang (17-KT) dan minuman lain bermatriks (20-K).

Akurasi

Cara penetapan akurasi, pada sampel uji dilakukan spike 50 ng/g arsenik (Saxena *et al.*, 2017). Pada sampel 0,5 g spike dilakukan dengan cara dipipet 250 µl larutan baku intermediet 100 ng/ml dimasukkan secara saksama pada sampel yang telah ditimbang dalam vessel *microwave*. Akurasi dengan larutan spike dilakukan sebanyak 8 kali. Setelah dilakukan pengukuran dan perhitungan, selanjutnya dihitung persen perolehan kembali. Berdasarkan besarnya spike, dihitung keberterimaan perolehan kembali (% rekovery) dengan rumus pada Persamaan (1).

Rekovery

$$(\% R) = \frac{(A-B)}{C} \cdot 100\% \dots\dots\dots(1)$$

Dimana A = kadar analit yang diperoleh dari sampel yang dispike, B = kadar analit dalam sampel, C = kadar analit yang ditambahkan (spike). Keberterimaan akurasi dengan mengacu AOAC (2016) Appendix F: SMPR.

Presisi

Cara penetapan presisi, yakni dari sampel spike yang dilakukan sebanyak 8 kali. Setelah sampel diukur dan dihitung kadar analitnya selanjutnya ditentukan ripitabilitasnya dengan mencari % RSD.

Besaran nilai presisi dihitung dengan mencari % RSD, dengan rumus pada Persamaan (2).

$$RSD (\%) = \frac{SD}{x} \cdot 100\dots\dots\dots(2)$$

Dimana $\bar{x}$ = nilai rata-rata. Keberterimaan presisi hasil hitung RSD dibandingkan dengan $CV_{Horwitz}$; $\% RSD \leq 2/3 CV_{Horwitz}$ atau $0,66 \times CV_{Horwitz}$. Rumus $CV_{Horwitz} (\%) = 2^{1-0,5 \log C}$. Log C adalah logaritma konsentrasi analit (dalam bentuk fraksi). Keberterimaan parameter presisi mengacu ke AOAC (2016) Appendix F: SMPR.

Linearitas

Penetapan linearitas dilakukan untuk melihat tingkat linieritas metode pada daerah linier yang disesuaikan dengan rentang tujuan pengamatan berdasarkan persyaratan kadar analit dalam sampel. Pada uji linearitas digunakan seri larutan yang berbeda konsentrasinya dengan kadar analit dalam sampel 25, 50, 75, 100, 125, dan 150% kadar arsenik dalam sampel (Harmita, 2004).

Berdasarkan kurva regresi yang dibentuk selanjutnya ditentukan besaran nilai koefisien variansi regresi linier (V_{x0}) dan dibandingkan dengan angka keberterimaannya. Keberterimaan linearitas, ditetapkan dengan langkah menghitung harga b (*slope*); a (*intercept*) dan r (koefisien korelasi), selanjutnya diterima atau *compliance* jika $r \geq 0,99$ (cemaran/residu) dan $V_{x0} \leq 5\%$. Nilai koefisien variansi regresi linier (V_{x0}) dihitung berdasarkan simpangan baku residu (Sy/x) dengan rumus pada Persamaan (3) dan (4).

$$\frac{Sy}{x} = \sqrt{\frac{\sum(Y_i - Y_c)^2}{n-2}} \dots\dots\dots(3)$$

$$V_{x0} = \frac{Sy/x}{b \cdot \bar{x}_{rata-rata}} \cdot 100\% \dots\dots\dots(4)$$

Dimana, $b = slope$; $\bar{x}_{rata-rata}$ = kadar analit standar rata-rata dalam larutan baku seri; n = jumlah titik seri.

Sensitifitas

Sensitifitas ditetapkan berdasarkan Batas deteksi atau LOD (*Limit of Detection*) dan Batas kuantitasi atau LOQ (*Limit of Quantification*) yang dilaporkan dengan satuan yang sama dengan satuan kadar analit dalam sampel yang tercantum dalam persyaratan (standar). Sensitifitas dapat dicari

berdasar standar deviasi residual kurva baku (Sy/x) ataupun berdasar blanko. Batas deteksi = $3(Sy/x)/slope$ atau dapat juga batas deteksi (LOD) = nilai rata-rata blanko + 3SD, dan batas kuantitasi (LOQ) = Nilai rata-rata blanko + 10 SD. Perhitungan parameter batas deteksi dengan melakukan pengulangan minimal 6 kali menggunakan matrik blanko. Jika matrik blanko tidak memberikan respon, dilakukan spike dengan analit sekecil mungkin, mengacu pada AOAC (2019) Appendix K.

Pengolahan Data

Data diolah menggunakan Software Microsoft Excel. Kadar arsenik dihitung dengan berdasarkan kurva kalibrasi. Konsentrasi arsenik dalam sampel dihitung menggunakan rumus pada Persamaan (5).

$$C \text{ (ng/g)} = \frac{((Y-a-blk)/b) \cdot V \cdot Fp}{W} \dots\dots\dots(5)$$

Dimana, C adalah konsentrasi arsenik dalam sampel (ng/g). Y dan blk adalah absorbans sampel dan blanko hasil pembacaan alat AAS, sedangkan a , b , V , Fp dan W berturut-turut adalah *intercept*, *slope*, volume sampel uji (ml), faktor pengenceran dan bobot sampel uji (g).

Uji perbandingan dua program digesti *microwave* dilakukan terhadap parameter verifikasi. Uji t dua ekor ($\alpha = 0,05$) dilakukan terhadap dua perlakuan tersebut untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbandingan Dua Program Digesti Microwave

Kurva baku kalibrasi merupakan dasar penetapan kadar total arsenik. Kurva kalibrasi yang diperoleh dari hasil pengukuran disajikan pada Gambar 1, Gambar 2 dan Tabel 1. Kurva tersebut memiliki *slope* 0,0368 dan 0,0348 masing-masing untuk sampel bermatriks dan sampel air. Atribut lain untuk *intercept* dan koefisien korelasi adalah -0,00142 dan 0,999 pada sampel bermatriks yaitu bubur siap

saji non-registrasi (01-K) dan pangan selingan siap saji (05-K) dan minuman lain bermatriks (20-K), serta -0,00123 dan 0,995 untuk sampel

air (17-KT). Parameter tersebut memenuhi syarat linearitas yaitu 0,99.

Tabel 1. *Slope*, *intercept* dan koefisien korelasi kurva baku kerja yang digunakan penetapan kadar total As (t-As) dengan AAS-HVG dalam beberapa matriks makanan pendamping ASI (MP-ASI)

Matriks Sampel	<i>Slope</i>	<i>Intercept</i>	R ²
SPL 01-K	0,04	-0,001	0,99
SPL 05-K	0,04	-0,001	0,99
SPL 17-KT	0,04	-0,001	0,99
SPL 20-K	0,04	-0,001	0,99

Keterangan: SPL 01-K: bubur siap saji non-registrasi, SPL 05-K: makanan selingan siap saji, SPL 17-KT: air minum galon isi ulang, SPL 20-K: minuman lain

Gambar 1. Kurva baku kerja penetapan kadar total arsenik dalam matriks air. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga ulangan

Program digesti *microwave* dirancang berdasarkan jenis kandungan matriks sampel pangan. Sampel yang mengandung lemak atau minyak lebih sulit terurai daripada protein dan protein lebih sulit terurai daripada selulosa atau karbohidrat. Kebutuhan energi *microwave* sebanding dengan tingkat kemudahan pemutusan rantai karbon. Program *microwave* yang optimal menentukan keteruraian matriks sampel yang lebih sempurna.

Gambar 2. Linearitas metode pada rentang konsentrasi t-As 25-150 ng/g dalam matriks komposit makanan MP-ASI, dengan atribut kurva slope $b = 0,0368$, *intercept* $a = -0,00108$, koefisien korelasi $R = 0,997$ dan koefisien variasi garis regresi $V_x = 0 = 4,24\%$. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga ulangan

Evaluasi program *microwave* dilakukan terhadap hasil perhitungan akurasi dan presisi metode penetapan kadar. Hasil perhitungan parameter akurasi dan presisi disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Rata-rata akurasi sampel bermatriks 84,79% hingga 104,57% pada program *microwave* pertama dan 78,31% hingga 90,54% pada program *microwave* pembeding. Pada sampel air, *mean* akurasi 64,43% pada program *microwave* pertama dan 61,78% pada program *microwave* pembeding. Ketidakpastian pengukuran diperluas sebesar 0,27 hingga 0,30.

Semua rata-rata dan rentang akurasi pada program pertama dan pembanding sesuai dengan syarat keberterimaan verifikasi (60-115%) (AOAC, 2016). Program pertama maupun pembanding dapat digunakan sebagai program digesti, tetapi berdasarkan Uji t, kedua program berbeda secara signifikan terhadap akurasi yang dihasilkan. Rata-rata akurasi program pertama berbeda secara nyata dengan program kedua, sehingga program pertama dapat dipilih sebagai program *microwave* dalam penetapan kadar total arsenik.

Presisi metode disajikan sebagai %RSD. Hasil perhitungan presisi verifikasi metode disajikan pada Tabel 3. Persentase RSD sampel bermatriks pada program

pertama berkisar 6,63% hingga 13,41% dan pada sampel air 4,66%. Pada program pembanding %RSD lebih besar daripada program pertama yaitu 6,55% hingga 14,81% pada sampel bermatriks dan 4,28% pada sampel air. Semua rata-rata %RSD pada program pertama dan pembanding memenuhi syarat keberterimaan verifikasi karena kurang dari 2/3 CV Horwitz. Kedua program digesti bisa digunakan dalam digesti sampel. Secara keseluruhan %RSD program pertama lebih kecil daripada program kedua, dan hal ini berbeda nyata secara uji statistik, sehingga program pertama dapat dijadikan sebagai metode digesti terpilih.

Tabel 2. Rata-rata rentang rekovery pada dua perlakuan penetapan kadar t-As dengan AAS-HVG pada beberapa kelompok komposit MP-ASI sebagai parameter akurasi

Matriks Sampel	N	Program Pertama (P1)	Program Pembanding (P2)	Ketidakpastian Uk	Keberterimaan rekovery (%)
		Rekovery (%)	Rekovery (%)		
SPL 01-K	8	84,79 ^a (71,47-98,84)	82,59 ^b (64,70-103,12)	3,92	60 - 115
SPL 05-K	8	104,57 ^a (92,13-113,66)	90,54 ^b (76,48-115,66)	3,92	60 - 115
SPL 17-KT	8	64,43 ^a (58,76-68,22)	61,78 ^b (59,70-68,00)	3,92	60 - 115
SPL 20-K	7	89,61 ^a (79,29-99,86)	78,31 ^b (68,45-96,13)	3,92	60 - 115

Keterangan : angka yang diikuti huruf sama dalam baris yang sama tidak berbeda nyata dalam Uji-t 5%

Tabel 3. Rata-rata RSD dua perlakuan *microwave program* pada penetapan kadar t-As dengan AAS-HVG pada beberapa kelompok komposit MP-ASI sebagai parameter presisi

Matriks Sampel	N	Rata-rata RSD (%)	
		Program Pertama (P1)	Program Pembanding (P2)
SPL 01-K	8	8,15 ^a (15,24)	9,90 ^b (15,31)
SPL 05-K	8	6,63 ^a (15,32)	6,55 ^b (15,53)
SPL 17-KT	8	4,66 ^a (20,90)	4,28 ^b (21,01)
SPL 20-K	7	13,41 ^a (18,88)	14,81 ^b (19,04)

Keterangan : angka yang diikuti huruf sama dalam baris yang sama tidak berbeda nyata dalam Uji-t ($\alpha=0,05$). Angka dalam kurung adalah 0,66 RSD Horwitz

Hasil Verifikasi Metode Terpilih

Akurasi dilihat dari persentase rekovery yang didapatkan. Rekovery merupakan perolehan kembali analit arsenik yang ditambahkan ke dalam matriks. Berdasarkan dua program *microwave* yang digunakan, rekovery keduanya terpenuhi (Tabel 2), tetapi secara

signifikan program pertama memberikan rekovery yang lebih baik, oleh karena itu program digesti ini yang dipilih untuk penetapan kadar total arsenik. Sampel bermatriks diwakili oleh bubur siap saji non-registrasi (01-K), pangan selingan siap saji (05-K) dan minuman lain bermatriks (20-K), secara berturut-turut menunjukkan

rata-rata rekovery 84,79%; 104,57%, dan 89,61%. Rekovery analit rata-rata (rentang) pada sampel air minum (17-KT) sebesar 64,43% (58,76-68,22%). Rentang rekovery yang diperoleh pada semua sampel memenuhi syarat keberterimaan sebagaimana disebutkan diatas menurut AOAC (2016).

Presisi metode disajikan sebagai %RSD atau ripitabilitas atau kesaksamaan. Presisi metode pada program digesti yang terpilih disajikan pada Tabel 3. Tabel tersebut menunjukkan bahwa program pertama menunjukkan kesaksamaan yang lebih baik daripada program pembandingan pada semua sampel uji. Pada sampel bubur siap saji non-registrasi, sampel pangan selingan siap saji dan minuman lain bermatriks menunjukkan %RSD berturut-turut 8,15%; 6,63%, dan 13,41%, sedangkan pada sampel air minum isi ulang 4,66%, semua nilai RSD memenuhi syarat keberterimaan, karena kurang dari 2/3 CV Horwitz (AOAC, 2016).

Linearitas metode dalam verifikasi ini disajikan pada Gambar 2. Linearitas metode pada rentang konsentrasi t-As 25-150 ng/g dalam matriks komposit MP-ASI, mewakili 25-150% analit dalam sampel. Atribut kurva ditunjukkan dengan besaran $slope$ $b = 0,000386$, $intercept$ $a = -0,00108$, koefisien korelasi $R = 0,997$ dan koefisien variasi garis regresi $V_{x0} = 4,24\%$. Syarat keberterimaan R untuk analit cemarkan sebesar 0,99 dan syarat V_{x0} sebesar $< 5\%$, oleh karena itu metode yang dipakai disimpulkan linear (Harmita, 2004).

Sensitivitas metode menggambarkan kepekaan metode ini dalam menetapkan kadar total arsenik. Semakin kecil sensitivitas metode semakin baik. Sensitivitas diekspresikan sebagai batas deteksi dan batas kuantifikasi. Pada sampel bermatriks batas deteksi dan batas kuantifikasinya sebesar 0,04 ng/g dan 0,12 ng/g, sedangkan untuk sampel air 0,01 ng/ml dan 0,02 ng/ml. Batas deteksi ini lebih kecil dari peneliti sebelumnya 0,069 ng/ml dan 0,21 ng/ml (Komorowicz dan Baralkiewicz, 2016).

SIMPULAN

Verifikasi metode dilakukan sebagai upaya penjaminan bahwa metode penetapan kadar total arsenik memenuhi syarat sesuai penggunaannya. Berdasarkan hasil pengujian verifikasi, program pertama digesti *microwave* (P1) dapat dipilih sebagai metode digesti dalam penetapan kadar total arsenik. Secara keseluruhan berdasarkan hasil verifikasi, metode terpilih (P1) dapat digunakan untuk penetapan kadar total arsenik dalam MP-ASI.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia yang telah memberikan beasiswa studi S3 dan biaya riset kepada sdr. Suyanto.

DAFTAR PUSTAKA

- Alava, -P., Van de Wiele, -T., Tack, -F., Du Laing, -G., 2012. Extensive grinding and pressurized extraction with water are key points for effective and species preserving extraction of arsenic from rice. *Analytical Methods*. 4, 1237-1243. <https://doi.org/10.1039/c2ay25094b>
- AOAC, 2019. Appendix K: Guideline for Dietary Supplements and Botanical
- AOAC, 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements
- AOAC, 2005. AOAC Official Method 999.10 Lead, Cadmium, Zinc, Cooper, and Iron in Foods
- de Oliveira, -E., 2003. Sample preparation for atomic spectroscopy: Evolution and future trends. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14, 174-182. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200004>

- Gómez-Ariza, A., -L., Morales, -E., Giráldez, -I., Sánchez-Rodas, -D., Velasco, -A., 2001. Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants. *Journal of Chromatography A*. 938, 211-224. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01103-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01103-7)
- Harmita, 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1, 117-135. <http://dx.doi.org/10.7454/psr.v1i3.3375>
- ISO/IEC 17025:2017, 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- Komorowicz, -I., Baralkiewicz, -D., 2016. Determination of total arsenic and arsenic species in drinking water, surface water, wastewater, and snow from Wielkopolska, Kujawy-Pomerania, and Lower Silesia provinces, Poland. *Environmental Monitoring and Assessment*. 188, 504. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5477-y>
- Müller, EI, Mesko, MF, Moraes, DP, Korn, M. das GA, Flores, ÉMM. 2014. 'Wet Digestion Using Microwave Heating'. Dalam EMM Flores (Ed.). *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. Elsevier, USA
- Narukawa, -T., Suzuki, -T., Inagaki, -K., Hioki, -A., 2014. Extraction techniques for arsenic species in rice flour and their speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 130, 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.001>
- Nugraha, W, -C., Elishian, -C., Ketrin, -R., 2017. Determination of total arsenic in fish by hydride-generation atomic absorption spectrometry: Method validation, traceability and uncertainty evaluation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 60, 012036. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/60/1/012036>
- Otles, S, Ozyurt, VH. 2015. *Sampling and Sample Preparation, Handbook of Food Chemistry*. Springer, New York
- Raber, -G., Stock, -N., Hanel, -P., Murko, -M., Navratilova, -J., Francesconi, K, -A., 2012. An improved HPLC-ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish. *Food Chemistry*. 134, 524-532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.113>
- Saxena, S, -K., Karipalli, A, -R., Krishnan, A, -A., Rangasamy, -R., Malekadi, -P., Singh, D, -P., Vasu, -V., Singh, V, -K., 2017. Determination and uncertainty analysis of inorganic arsenic in husked rice by solid phase extraction and atomic absorption spectrometry with hydride generation. *Journal of AOAC International*. 100, 598-602. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0055>
- Welna, -M., Szymczycha-Madeja, -A., Pohl, -P., 2015. Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 65, 122-136. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.007>
- Würfels, -M., Jackwerth, -E., Stoeppler, -M., 1989. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. *Analytica Chimica Acta*. 226, 1-16. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)80900-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)80900-9)