

## Validasi Metode Analisis Kalsium Pada Bungkil Kedelai Dengan Metode Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS)

Ikhwan Hadianto<sup>1</sup>, Siska Devi K.<sup>1</sup>, Nur Latifah<sup>1</sup>, Muhammad Rio Rafif<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, muhammadrio210@mail.ugm.ac.id

Submisi: 21 Januari 2026, Penerimaan: 11 Maret 2026

### ABSTRAK

Penelitian dilakukan bertujuan untuk memvalidasi metode penentuan kadar kalsium pada bungkil kedelai menggunakan Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) sesuai ISO/IEC 17025:2017. Kalsium merupakan mineral esensial bagi makhluk hidup. Analisis kandungan kalsium dapat dilakukan dengan menggunakan AAS. Metode pengujian AAS pada bungkil kedelai belum memiliki metode baku penerapannya, sehingga perlu validasi metode. Metode Validasi metode meliputi pengujian linearitas, sensitivitas, presisi, dan akurasi. Hasil penelitian menunjukkan linearitas yang sangat baik pada rentang 0–6 mg/L dengan nilai  $r^2$  sebesar 0,9962, dengan nilai LOD dan LOQ masing-masing 0,08 mg/L dan 0,28 mg/L. Nilai RSD presisi berada di bawah batas 2/3 RSD Horwitz, dan recovery mencapai 98,68%. Metode ini dinyatakan valid dan layak untuk analisis rutin kalsium pada bungkil kedelai.

**Kata kunci:** Mineral, Pakan, Validasi Metode, Spectrophotometry, Destruksi

### ABSTRACT

This study was conducted to validate a method for the determination of calcium content in soybean meal using Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) in accordance with ISO/IEC 17025:2017. Calcium is an essential mineral for living organisms. The analysis of calcium content can be performed using AAS. However, the application of the AAS method for soybean meal has not yet been standardized; therefore, method validation is required. The method validation parameters included linearity, sensitivity, precision, and accuracy. The results showed excellent linearity over the concentration range of 0–6 mg/L, with a coefficient of determination ( $r^2$ ) of 0.9962. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.08 mg/L and 0.28 mg/L, respectively. The relative standard deviation (RSD) for precision was below the 2/3 Horwitz RSD limit, and the recovery value reached 98.68%. Therefore, the method was considered valid and suitable for the routine analysis of calcium in soybean meal.

**Keywords :** Mineral, Feed, Method Validation, Spectrophotometry, Digestion

## LATAR BELAKANG

Kalsium merupakan mineral makro esensial yang berperan penting dalam menunjang berbagai fungsi biologis pada hewan dan manusia. Mineral ini berperan utama sebagai prekursor pembentukan serta pemeliharaan tulang dan gigi pada makhluk hidup, dan memiliki peran dalam berbagai proses biokimia maupun fisiologis, seperti kontraksi otot, transmisi impuls saraf, dan regulasi enzimatis (Bindari et al., 2013). Dalam nutrisi ternak, kandungan kalsium pada bahan pakan menjadi parameter krusial dalam penyusunan ransum, mengingat biaya pakan memiliki peran berkisar 60 hingga 70% dari total biaya produksi industri peternakan. Oleh karena itu, penentuan kadar kalsium yang akurat sangat diperlukan untuk menghasilkan formulasi ransum yang seimbang secara nutrisi, efisien secara ekonomi, dan berkelanjutan (Koloud et al., 2020).

*Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS) merupakan salah satu teknik analisis kadar mineral yang banyak digunakan dengan instrumentasi alat, termasuk salah satunya kalsium, karena memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi serta pengoperasian yang relatif sederhana. Metode ini memungkinkan pendeteksian unsur secara spesifik dengan gangguan spektral yang minimal, sehingga menghasilkan data kuantitatif yang andal pada berbagai matriks sampel (Khopkar, 2014; Amalia et al., 2023). Dengan karakteristik tersebut, AAS menjadi metode pilihan untuk analisis kalsium secara rutin pada bahan pakan dan produk pertanian. Pengujian AAS diawali dengan destruksi menggunakan *microwave digester*. Alat *microwave digester* digunakan karena kelebihanannya yang cepat, efisien, dan minim kontaminasi sehingga pengujian dapat dilakukan secara efektif.

Meskipun AAS telah banyak diaplikasikan untuk analisis mineral, metode standar untuk penentuan kadar kalsium pada bahan pakan berupa bungkil kedelai masih terbatas. Keterbatasan ini menuntut dilakukannya validasi atau verifikasi metode sebelum diterapkan secara rutin. Berdasarkan standar ISO/IEC 17025:2017, suatu metode analisis dinyatakan layak digunakan apabila karakteristik kinerjanya telah divalidasi dan memenuhi persyaratan yang ditetapkan. Parameter validasi metode meliputi linearitas dan rentang kerja, sensitivitas yang dinyatakan sebagai batas deteksi atau *Limit of Detection* (LOD) dan batas kuantifikasi atau *Limit of Quantification* (LOQ), presisi yang mencakup keterulangan dan presisi antara, serta akurasi yang dievaluasi melalui uji perolehan kembali (*recovery*) (EURACHEM, 2014; ISO, 2017).

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode penentuan kadar kalsium pada bungkil kedelai menggunakan AAS yang dikombinasikan dengan preparasi sampel melalui *Microwave digestion*. Evaluasi kinerja metode dilakukan sesuai dengan parameter validasi yang dipersyaratkan dalam ISO/IEC 17025:2017. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan metode analisis yang akurat, presisi, aplikatif, serta efisien, sehingga dapat digunakan secara andal dalam pengujian rutin kadar kalsium pada bungkil kedelai sebagai bahan pakan ternak

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi timbangan analitik Mettler-Toledo (GmbH, Greifensee, Swiss), peralatan gelas (labu ukur, erlenmeyer, pipet volumetrik, mikropipet Eppendorf), *close Microwave*

*digestion* tipe MARS 6 iWave (CEM), tabung teflon polytetrafluoroethylene (PTFE) vessel, tube mill (IKA), dan *Atomic Absorption Spectrophotometry* Flame (Thermosience iCE 3000). Sampel berupa bahan pakan berupa bungkil kedelai yang diperoleh dari peternak lokal di Kabupaten Sleman.

Bahan kimia yang digunakan meliputi air bebas ion, asam nitrat (HNO<sub>3</sub>) 65% *for analysis* EMSURE (Merck), asam perklorat (HClO<sub>4</sub>) 60% *for analysis* EMSURE (Merck), aquadest, serta larutan standar kalsium 1000 mg/L (Merck-SRM).

#### **Preparasi sampel**

Sebanyak 1 gram sampel bungkil kedelai ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung PTFE vessel, kemudian ditambahkan 10 mL HNO<sub>3</sub> 65% dan 2 mL HClO<sub>4</sub> 60%. Campuran sampel dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruang sebagai tahap predigesti. Selanjutnya, sampel didestruksi menggunakan sistem microwave digestion. Blanko disiapkan dengan prosedur yang sama tanpa penambahan sampel.

#### **Destruksi basah menggunakan close Microwave digestion**

Proses destruksi basah dilakukan mengikuti prosedur standar CEM untuk matriks pakan. Program microwave terdiri atas dua tahap, yaitu pemanasan hingga suhu 200 °C selama 15 menit, diikuti dengan penahanan pada suhu tersebut selama 15 menit. Setelah proses destruksi selesai, larutan didinginkan lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan air bebas ion hingga volume tanda batas.

#### **Pembuatan larutan standar kalsium**

Larutan standar kalsium disiapkan melalui pengenceran larutan induk kalsium 100 mg/L. Dari larutan induk tersebut dibuat enam seri larutan standar dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 mg/L,

masing-masing dengan volume akhir 10 mL menggunakan air bebas ion sebagai pelarut

#### **Validasi Metode**

##### **Linieritas**

Uji linearitas dilakukan dengan membaca larutan standar kalsium yang telah dibuat menggunakan AAS pada panjang gelombang 422,7 nm. Setiap konsentrasi standar dianalisis sebanyak tiga kali ulangan. Hubungan antara konsentrasi dan absorbansi dievaluasi melalui pembuatan kurva kalibrasi, dengan kriteria keberterimaan koefisien determinasi ( $r^2$ ) lebih besar dari 0,995.

##### **Sensitivitas (Limit of Detection dan Limit of Quantification)**

Penentuan sensitivitas melalui tes LOD dan LOQ dilakukan berdasarkan pengukuran blanko matriks yang dianalisis sebanyak sepuluh kali ulangan. Blanko matriks diperlakukan dengan prosedur yang sama seperti sampel, kemudian absorbansinya diukur menggunakan AAS. Nilai sensitivitas akan didapatkan berdasarkan standar deviasi respons blanko dan kemiringan (slope) kurva kalibrasi. Perhitungan sensitivitas dilakukan sesuai standar pada rumus berikut :

$$LOD = \frac{3,3 \times SB}{slope (b)}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SB}{slope (b)}$$

(Squadrone *et al.*, 2010)

##### **Presisi**

Presisi metode dievaluasi melalui uji keterulangan dan presisi antara. Uji keterulangan dilakukan dengan sepuluh kali pengukuran pada sampel yang sama dalam kondisi analisis identik. Presisi antara diuji melalui pengulangan analisis pada hari yang berbeda dengan metode dan instrumen yang sama. Presisi dinyatakan sebagai RSD (%) dan dibandingkan dengan nilai 2/3 RSD Horwitz sebagai batas penerimaan. Perhitungan

presisi dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

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

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

$$\% CV \text{ Horwitz} = (2^{1-0,5 \log C})$$

SD = Standard Deviasi konsentrasi sampel

x = Rata-rata konsentrasi ulangan pengujian

n = jumlah pengulangan uji

C = Konsentrasi rata-rata dari 10 kali Pengujian

#### Akurasi

Akurasi metode ditentukan menggunakan uji *recovery test* atau uji perolhen kembali dengan metode *spiking* yang dilakukan dengan penambahan larutan standar. Standar kalsium ditambahkan ke dalam sampel bungkil kedelai pada tiga tingkat konsentrasi, yaitu 50%, 100%, dan 150% dari konsentrasi target. Setiap level *spiking* dianalisis sebanyak tiga kali ulangan, dan persentase *recovery* dihitung untuk menilai akurasi metode. Persentase akurasi (% *Recovery*) dihitung dengan rumus berikut :

$$\% R = \frac{C_2 - C_1}{S} \times 100$$

R = Perolehan kembali (% *Recovery*)

S = Kadar analit yang ditambahkan pada sampel

c1 = Konsentrasi sampel

c2 = Konsentrasi campuran sampel dan analit

Syarat keberterimaan % *recovery* mengacu pada AOAC (2016) yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Keberterimaan *recovery* (%)

Konsentrasi	Keberterimaan <i>recovery</i> (%)
100%	98-102
10%	98-102
1%	97-103
0,1%	95-105
100 mg/kg	90-107
10 mg/kg	80-110
1 mg/kg	80-110
100 ug/kg	80-110
10 ug/kg	60-115
1 ug/kg	40-120

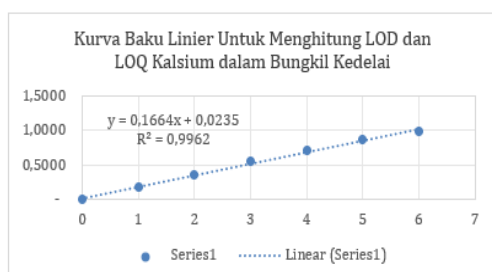
#### HASIL DAN PEMBAHASAN Linieritas

Linieritas dilakukan untuk mengetahui serta mengevaluasi kemampuan alat serta metode dalam menghasilkan respon yang sebanding pada berbagai macam konsentrasi analit. Kurva kalibrasi disusun berdasarkan hubungan antara konsentrasi standar kalsium dan absorbansi yang diukur menggunakan AAS. Parameter linearitas dinilai melalui persamaan regresi linear dan nilai koefisien determinasi ( $r^2$ ). Pengujian linieritas dilakukan untuk memastikan bahwa respon absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi yang diinginkan pada rentang pengukuran yang ditetapkan. Menurut Taverniers *et al.* (2004) validasi metode harus mencakup penilaian linieritas sebagai bagian dari jaminan mutu laboratorium analitik. Hasil pengukuran linieritas dapat dilihat pada tabel 2

Tabel 2. Hasil pengukuran uji linieritas

Paremeter	Nilai
Rentang linier	0-6 mg/L
Koefisien determinasi ( $r^2$ )	0.9962
Slope	0.1664
Intercept	0.0235

Hasil pengujian menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi standar kalsium 0 hingga 6 mg/L menghasilkan persamaan regresi  $y=0,1664x+0,02345$  dengan koefisien determinasi ( $r^2$ ) memenuhi persyaratan keberterimaan minimal  $r^2 \geq 0.995$  yang direkomendasikan BSN (2017) maupun pedoman Eurachem (1998). Hal ini mengindikasikan bahwa respon instrumen proporsional terhadap konsentrasi kalsium dengan rentang yang telah dibuat, sehingga dapat digunakan secara andal untuk perhitungan kadar kalsium dalam sampel bungkil kedelai. Penelitian Zain dan Malik (2024) Nilai determinasi  $r^2$  sebesar 0,9997 dengan 6 variasi konsentrasi juga suah memenuhi persyaratan keberterimaan. Berdasarkan hasil yang didapatkan, persamaan regresi yang diperoleh dapat diaplikasikan untuk menghitung kadar kalsium dalam sampel bungkil kedelai. Kurva hasil lineritas dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Kurva kalibrasi larutan standar kalsium

### Sensitifitas

Sensitivitas ditentukan melalui evaluasi nilai LOD dan LOQ. Menurut Eurachem (1998) Nilai *Limit of Detection* didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah yang masih dapat terdeteksi oleh instrumen analitik, namun belum dapat ditentukan secara kuantitatif dengan tingkat presisi dan akurasi yang memenuhi persyaratan validasi metode. Sedangkan LOQ menurut ICH (2005) merupakan konsentrasi analit terendah yang masih dapat diukur secara kuantitatif dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat diterima. Hasil LOD dan LOQ dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data LOD dan LOQ kalsium

Sampel	Batas Deteksi (LOD)	Batas Kuantifikasi (LOQ)
Bungkil Kedelai	0,08 mg/L	0,28 mg/L

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai LOD dan LOQ berada jauh di bawah konsentrasi terendah sampel yang dianalisis (2 mg/L), hal tersebut menunjukkan bahwa hasil pengujian telah memadai pada metode tersebut pada kadar rendah. Menurut Eurachem (1998) kriteria keberterimaan LOD yang baik adalah apabila nilainya cukup kecil sehingga dapat menjangkau konsentrasi target yang relevan dengan tujuan analisis. yang menandakan bahwa metode ini mampu melakukan pengukuran kuantitatif konsentrasi yang dianalisis. Penelitian Zain dan Malik (2024) menyatakan nilai LOD dan LOQ yang baik adalah lebih kecil dari pada sampel yang diuji, Nilai yang relatif kecil ini membuktikan bahwa metode yang digunakan secara efektif dapat diterapkan

pada sampel bungkil kedelai karena memiliki sensitivitas yang tinggi.

### Presisi

Presisi metode dievaluasi melalui uji presisi keterulangan dan presisi antara (antar hari atau teknisi). Menurut AOAC (2016) Pengukuran presisi merupakan parameter yang menggambarkan kedekatan hasil ulangan dari pengukuran suatu sampel homogen dalam kondisi tertentu, dinyatakan dalam bentuk RSD (%). Presisi keterulangan menunjukkan tingkat kedekatan hasil pengukuran ketika analisis dilakukan berulang kali dalam kondisi yang sama, yaitu instrumen, analis, laboratorium, dan waktu yang sama. Presisi antara menunjukkan kesesuaian hasil analisis pada kondisi berbeda dengan menggunakan instrumen, sampel dan personel yang sama namun dilakukan pada waktu yang berbeda. Parameter tersebut penting untuk menilai ketahanan metode terhadap variasi operasional sehari-hari. Evaluasi dalam penentuan presisi antara juga dievaluasi menggunakan RSD (%) dan dibandingkan dengan nilai  $2/3$  RSD Horwitz sebagai batas penerimaan (Thompson, 2000; Horwitz & Albert, 2006). Hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Data Presisi

Parameter	Konsentrasi (mg/L)	RS Da (%)	$2/3$ RSD <sub>H</sub> (%)	Keterangan
Keterulangan	10	6,69	11,3	Diterima
Presisi antara	10	6,06	11,3	Diterima

Keterangan : RSD<sub>a</sub> : RSD analisis; RSD<sub>H</sub> : RSD Horwitz

Berdasarkan data hasil pengujian pada tabel 4, Nilai RSD hasil penelitian memiliki nilai yang jauh lebih rendah dibandingkan RSD Horwitz, sehingga

metode yang digunakan memiliki nilai presisi yang sangat baik. Horwitz dan Albert (2006) menyatakan bahwa Pengujian presisi dapat dinyatakan baik apabila nilai RSD (%) besarnya kurang dari atau sama dengan  $2/3$  CV Horwitz. Metode analisis kalsium yang telah dilakukan dapat dinyatakan memiliki presisi yang baik dan memenuhi persyaratan ISO/IEC 17025:2017.

### Akurasi

Akurasi menggambarkan tingkat kedekatan antara hasil pengukuran yang diperoleh dengan nilai acuan atau nilai sebenarnya dari analit yang dianalisis. Evaluasi akurasi metode dilakukan melalui uji perolehan kembali (*recovery test*) dengan penambahan standar kalsium (*spiking*) pada tiga tingkat konsentrasi, yaitu 50%, 100%, dan 150% dari konsentrasi target. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai akurasi sebesar 98,68% (Tabel 5). Zain dan Malik (2024) menyatakan nilai akurasi apabila masuk [ada %trueness. Menurut AOAC (2016), kriteria penerimaan akurasi pada konsentrasi analit sebesar 1 hingga 10 mg/L atau mg/kg adalah 80–110%, sementara pada konsentrasi yang lebih tinggi diperbolehkan pada kisaran 85–110%. Nilai *recovery* yang diperoleh dalam penelitian ini berada dalam batas yang direkomendasikan tersebut, sehingga metode analisis kalsium pada matriks bungkil kedelai dapat dinyatakan memiliki akurasi yang sangat baik dan memenuhi persyaratan validasi metode. Hasil uji akurasi dapat dilihat pada tabel 5.

### KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan Kesimpulan bahwa Metode analisis kalsium pada bungkil kedelai menggunakan destruksi microwave dan AAS Flame menghasilkan seluruh parameter uji telah sesuai dengan

persyaratan validasi metode, sehingga metode ini dapat digunakan untuk penentuan kadar kalsium pada bahan pakan bungkil kedelai atau pun bahan pakan berbasis bungkil kacang-kacangan.

Saran untuk penelitian kedepannya adalah dapat diperbanyak sampel matriks bahan pakan serta penelitian lanjutan mengenai mineral lain pada matriks yang serupa.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC International. 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th Edition*. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Rockville, MD, USA.
- Bindari, Y.R., S. Shrestha, N. Shrestha, dan Gaire. 2013. *Effects of nutrition on reproduction*. Adv Appl Sci Res. 4(1):421-429.
- BSN (Badan Standardisasi Nasional). 2017. SNI ISO/IEC 17025:2017 Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi. Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.
- CEM. 2020. *Application Note: Sample preparation of food using MARS 6 Microwave digestion system*. CEM Corporation.
- EURACHEM. 2014. *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics*. 2nd ed. Teddington (UK)
- Horwitz, W., & R. Albert. 2006. *The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision*. Journal of AOAC International, 89(4), 1095–1109. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1095>
- ICH. 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation, Geneva.
- ISO. 2017. *ISO/IEC 17025:2017 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. International Organization for Standardization.
- Khopkar, S.M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI Press. Jakarta.
- Koloud, A.A., C.L. Kaunang, R.A.V. Tuturoong, dan M.R. Waani. 2020. *Kecernaan kalsium dan fosfor ransum komplit berbasis tebon jagung pada ternak sapi peranakan ongole (PO)*. Zootec. 40(2):401-409
- Squadrone, S., P. Brizio, M. C. Abete, & E. Zanardi. 2010. *Determination of phosphorus in food samples by UV-Vis spectrophotometry*. Food Chemistry, 123(4), 1264–1267.

- Taverniers, I., M. De Loose, & E. Van Bockstaele. 2004. *Trends in quality in the analytical laboratory, II: analytical method validation and quality assurance*. Trends in Analytical Chemistry, 23(8), 535–552
- Thompson, M. 2000. *Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in analytical chemistry*. Analyst, 125: 385–386.
- Zain, A.A. dan Y. Malik. 2024. Verifikasi metode menggunakan *atomic absorption spectrophotometer* (AAS) analisis kadar Natrium dalam bijih nikel. Jurnal Penelitian Sains. 26(3):284-289.