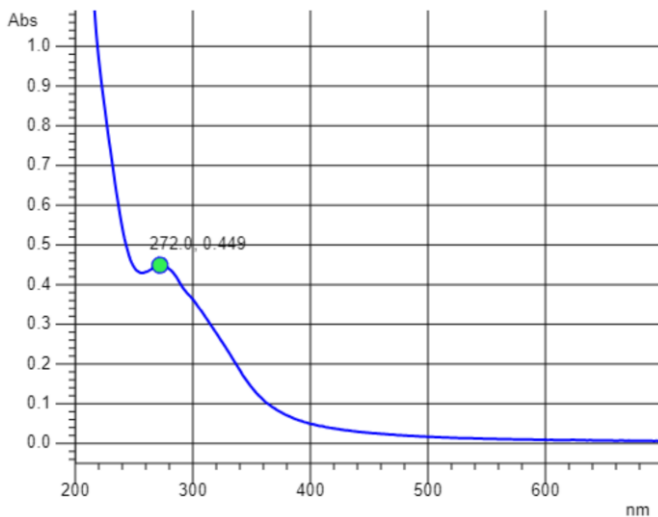


Lampiran:

A. Spesifisitas - selektivitas

Scanning panjang gelombang maksimum pada larutan jernih glukosa (tanpa metode kolorimetri). Scanning dilakukan pada rentang panjang gelombang 200 - 800 nm. Panjang gelombang maksimum 272 nm, dengan sepan 0,449. Oleh karena itu diperlukan derivatisasi agar glukosa dapat terbaca pada panjang gelombang visibel.



B. Linearitas

1. Pembuatan seri konsentrasi larutan glukosa untuk uji linearitas

Larutan stok yang digunakan dalam uji linearitas adalah D-glukosa (Dextrosa) 50 mM atau 9008 ppm dalam akuades steril. Berikut bobot penimbangan glukosa :

a. Larutan stock

Bobot Glukosa	225,2	mg
BM glukosa	180,16	gr/mol
Volume	25	mL
Konsentrasi	50	mM
	9008	ppm

b. Kons setelah perlakuan*

$$\begin{aligned} \text{Kons setelah perlakuan} &= M2 * \text{total pengenceran} \\ &= M2 * 0,0298 \end{aligned}$$

Pengenceran

$$\text{Pengenceran 1} = 400/840$$

Uji kapasitas glukosa saat inkubasi

400 μ L seri kons glukosa + 400 μ L seri kons senyawa + 40 μ L akuades

$$\text{Pengenceran 2} = 25/400$$

Derivatisasi metode Dubois

25 μ L larutan yang akan divalidasi + 375 μ L akuades + 400 μ L phenol 5% + 2 mL asam sulfat 98%

Total pengenceran $\frac{25}{25+375}$
 Larutan glukosa yang diuji ke metode dubois =
 $= 400/840 * 25/(25+375) = 0,0298$

c. Perhitungan
 $V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$
 $V1 \cdot 9008 = 1200 \cdot 281,5$
 $V1 = 37,5 \mu\text{L}$

$VA = V2 - V1$
 $= 1200 - 37,5$
 $= 1162,5 \mu\text{L}$

$V1$ = Volume larutan stok glukosa (μL)
 $M1$ = Konsentrasi larutan glukosa (mM atau ppm)
 $V2$ = Volume total (μL)
 $M2$ = Konsentrasi larutan seri glukosa (mM atau ppm)
 VA = Volume akuades yang ditambahkan (μL)

Data linearitas

V1 (μL)	M1		V2 (μL)	M2		VA (μL)	Kons setelah perlakuan* (ppm)	Absorbansi	
	(mM)	(ppm)		(mM)	(ppm)				
37,5	50	9008	1200	1,063	281,5	1162,5	8,38	0,108	
									0,108
									0,109
75	50	9008	1200	3,125	563	1125	16,76	0,202	
									0,202
									0,202
150	50	9008	1200	6,25	1126	1050	33,51	0,425	
									0,425
									0,425
300	50	9008	1200	12,5	2252	900	67,02	0,755	
									0,756
									0,756
600	50	9008	1200	25	4504	600	134,05	1,371	
									1,371
									1,371
1200	50	9008	1200	50	9008	0	268,10	2,569	
									2,567
									2,568

2. Kurva linearitas

Kurva linearitas diperoleh dengan membuat regresi linier yang diperoleh dari konsentrasi setelah perlakuan (X) vs absorbansi (Y).

Data LOD & LOQ

Konsentrasi (X)	Absorbansi (Y)	X'	Y	Y'	Y-Y'	(Y-Y') ²
	0,108					
8,38	0,108	3,18	0,108	0,157	-0,0488	0,0024
	0,109					
	0,202					
16,76	0,202	13,15	0,202	0,236	-0,0339	0,0012
	0,202					
	0,425					
33,51	0,425	36,87	0,425	0,393	0,0316	0,0010
	0,425					
	0,755					
67,02	0,756	72,05	0,756	0,708	0,0473	0,0022
	0,756					
	1,371					
134,05	1,371	137,51	1,371	1,338	0,0325	0,0011
	1,371					
	2,569					
268,1	2,567	264,85	2,568	2,599	-0,0305	0,0009
	2,568					
Total						0,0088

C. LOD dan LOQ

1. Perhitungan tabel

X = Konsentrasi teoritis (ppm)

Y = Absorbansi yang diperoleh di laboratorium

X' = Konsentrasi yang diperoleh dari persamaan regresi, dengan mengganti Y menjadi nilai rata-rata absorbansi (ppm)

Contoh :

$$Y = 0,0094X' + 0,0788$$

$$X' = \frac{Y - 0,0788}{0,0094} = \frac{0,108 - 0,0788}{0,0094} = 3,18 \text{ ppm}$$

Y' = Absorbansi teoritis yang diperoleh dari persamaan regresi linier, dengan mengganti X menjadi nilai konsentrasi teoritis

Contoh :

$$Y' = 0,0094X' + 0,0788$$

$$Y' = 0,0094 \cdot 3,18 + 0,0788$$

$$= 0,157$$

Y-Y' = Selisih absorbansi actual laboratorium dengan absorbansi perhitungan

Data LOD & LOQ						
Konsentrasi (X)	Absorbansi (Y)	X'	Y	Y'	Y-Y'	(Y-Y') ²
8,38	0,087 0,093 0,092	4,42	0,090	0,109	-0,0182	0,0003
16,76	0,133 0,142 0,140	14,85	0,138	0,147	-0,0088	0,0001
33,51	0,221 0,231 0,226	33,86	0,226	0,224	0,0016	0,0000
67,02	0,407 0,413 0,410	73,86	0,410	0,378	0,0315	0,0010
134,05	0,702 0,699 0,702	137,12	0,701	0,687	0,0141	0,0002
268,1	1,298 1,307 1,306	268,21	1,304	1,303	0,0005	0,0000
Total						0,0016

2. Penetapan LOD dan LOQ dilakukan sesuai perhitungan berikut:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD_{residual}}{slope}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD_{residual}}{slope}$$

Keterangan

$$y = bx + a$$

$$Y = 0,0094 X + 0,0788$$

jumlah data (n)	6
n-1	5
SD	0,042
Slope (b)	0,0094
Intercept (a)	0,0784
LOD (3SD/b)	13,37
LOQ (10SD/b)	44,55

D. Akurasi dan Presisi

1. Tabel kriteria keberterimaan akurasi berdasarkan AOAC

Kriteria keberterimaan akurasi didasarkan pada nilai perolehan Kembali atau recovery. Akurasi dilakukan pada rentang konsentrasi glukosa 8,38 – 268,1 ppm sehingga pada tabel harapan perolehan kembali berdasarkan konsentrasi analit, akurasi yang dilakukan di laboratorium berada pada rentang 1 – 1000 ppm. Persentase perolehan kembali mengikuti nilai perolehan kembali terbesar berdasarkan rentang tersebut yaitu 95 – 105%. Hal tersebut dimaksudkan agar mendapatkan data yang representatif.

Table A5. Expected recovery as a function of analyte concentration^a

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	Mean recovery, %
100	1	100%	98–102
10	10 ⁻¹	10%	
1	10 ⁻²	1%	97–103
0.1	10 ⁻³	0.1%	95–105
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90–107
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80–110
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	60–115
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	40–120

^a Table excerpted from AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998) AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA.

2. Tabel kriteria keberterimaan presisi berdasarkan AOAC
 Kriteria keberterimaan presisi didasarkan pada nilai RSD. Presisi dilakukan pada rentang konsentrasi glukosa 8,38 – 268,1 ppm sehingga pada tabel presisi berdasarkan konsentrasi analit, akurasi yang dilakukan di laboratorium berada pada rentang 1 – 1000 ppm. Nilai RSD mengikuti nilai RSD terbesar berdasarkan rentang tersebut yaitu 3,7%. Hal tersebut dimaksudkan agar mendapatkan data yang representatif.

Table A4. Expected precision (repeatability) as a function of analyte concentration^a

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	RSD, %
100	1	100%	1.3
10	10 ⁻¹	10%	1.9
1	10 ⁻²	1%	2.7
0.1	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	11
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	15
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	21
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	30

^a Table excerpted from AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998) AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA.

The precision of a method is the closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions. Precision is usually expressed in terms of imprecision and computed as a relative standard deviation of the test results. The imprecision of a method increases as the concentration of the analyte decreases. This table provides targets RSDs for a range of analyte concentrations.