

VALIDASI METODE UJI NITRAT ($\text{NO}_3\text{-N}$) MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS 2600

Ni Nyoman Trisnawati^{1*}, Ni Putu Ayu Krismayanti¹, Putu Primantari Vikana Suari²,

¹Laboratorium Analitik UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Udayana, Badung, Bali, Indonesia

*nyomantrisnawati@unud.ac.id

²Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik, Universitas Udayana, Badung, Bali, Indonesia

ABSTRAK: Laboratorium memiliki peran strategis sebagai sarana penunjang pelaksanaan Tri Dharma Perguruan Tinggi, terutama dalam kegiatan pendidikan dan penelitian yang berorientasi pada pengembangan ilmu pengetahuan serta penerapannya bagi masyarakat. Di Universitas Udayana, salah satu laboratorium yang berperan aktif dalam mendukung pelaksanaan tersebut adalah Laboratorium Analitik UPT Laboratorium Terpadu, yang memberikan layanan pengujian sampel bagi mahasiswa, dosen, maupun masyarakat umum. Parameter yang sering menjadi permintaan analisis dari pelanggan adalah parameter uji nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$). Dalam kadar tinggi, nitrat dapat mencemari air tanah dan air permukaan, sehingga menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan dan kesehatan manusia. Untuk menghasilkan data analisis yang akurat dan dapat dipercaya serta dapat dipertanggungjawabkan, harus didukung oleh SDM yang kompeten, peralatan dan instrumen yang terkalibrasi, bahan kimia yang memenuhi standar pengujian (bersertifikat/CRM), dan metode uji sesuai SNI atau standar yang telah tervalidasi. Metode uji nitrat yang digunakan di Laboratorium Analitik mengacu pada SNI, namun terdapat modifikasi pada volume sampel dan pereaksi guna menyesuaikan dengan kondisi operasional di laboratorium. Oleh karena itu, metode tersebut harus divalidasi kembali sesuai syarat keberterimaan agar tetap sah digunakan termasuk untuk memastikan bahan kimia non-CRM yang digunakan tetap layak dan memenuhi persyaratan metode. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa metode uji linier, akurat, presisi, dan LOD serta LOQ terkonfirmasi dapat diterima dan valid. Luaran penelitian telah tercapai dengan diperolehnya metode uji nitrat yang tervalidasi dan dinyatakan layak digunakan di Laboratorium Analitik UPT Laboratorium Terpadu.

Kata kunci: brusin sulfat; larutan standar nitrat; nitrat; spektrofotometer UV-Vis 2600; validasi metode.

ABSTRACT: The laboratory serves a strategic role as a supporting facility for the implementation of the Tri Dharma of Higher Education, particularly in education and research activities focused on developing scientific knowledge and its application to society. At Udayana University, one of the laboratories actively contributing to this mission is the Analytical Laboratory of the Integrated Laboratory Unit, which provides analytical testing services for students, lecturers, and the general public. Among the various test parameters, nitrate ($\text{NO}_3\text{-N}$) analysis is one of the most frequently requested by clients. At elevated concentrations, nitrates can contaminate groundwater and surface water, leading to adverse effects on the environment and human health. To ensure accurate and reliable analytical data, laboratory activities must be supported by competent personnel, properly calibrated instruments, and chemicals that meet testing standards such as Certified Reference Materials (CRM). In addition, testing methods must comply with SNI or other validated standards. The nitrate test method used in the Analytical Laboratory refers to SNI, however modifications were made to the sample and reagent volumes to adapt to the laboratory's operational conditions. Therefore, the method was revalidated to verify compliance with acceptance

criteria, including ensuring that the non-CRM chemicals used remained suitable and met the methodological requirements. The results of this study demonstrated that the nitrate test method is linear, accurate, precise, with acceptable and valid limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The research objective has been achieved by establishing a validated nitrate test method that is confirmed to be suitable for use in the Analytical Laboratory of the Integrated Laboratory Unit.

Keywords: brucine sulfate; nitrate standard solution; nitrate; UV-Vis spectrophotometer 2600; method validation.

1 PENDAHULUAN

Salah satu laboratorium di Universitas Udayana yang berperan aktif dalam mendukung pelaksanaan Tri Dharma Perguruan Tinggi adalah Laboratorium Analitik UPT Laboratorium Terpadu. Dalam bidang pendidikan melayani praktikum dan praktik kerja lapangan kepada mahasiswa. Bidang penelitian melayani dan membantu penelitian mahasiswa S1, S2, S3 dan dosen. Bidang pengabdian kepada masyarakat yakni melayani permintaan analisis sampel seperti air dan air limbah. Parameter yang sering menjadi permintaan analisis dari pelanggan adalah parameter uji nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$). Ion nitrat (NO_3^-) merupakan salah satu parameter kualitas air yang paling umum terdeteksi pada air tanah dan air permukaan akibat aktivitas antropogenik seperti pertanian intensif, pembuangan limbah domestik, dan proses industri modern [1, 2]. Nitrat bersifat relatif stabil secara kimia di lingkungan perairan dan cenderung terakumulasi, sehingga sering digunakan sebagai indikator pencemaran nutrisi pada sistem perairan. Paparan nitrat dalam konsentrasi tinggi diketahui berisiko terhadap kesehatan manusia, khususnya methemoglobinemia pada bayi serta potensi pembentukan senyawa N-nitroso yang bersifat karsinogenik, sebagaimana dilaporkan dalam kajian toksikologi terbaru [1, 3]. Oleh karena itu, pencemaran nitrat menjadi salah satu perhatian dan perlu pemantauan secara akurat dengan metode analisis yang tervalidasi.

Salah satu cara untuk menguji nitrat adalah dengan metode Brusin, yaitu

pengujian menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metode Brusin berbasis spektrofotometer UV-Vis masih banyak digunakan hingga saat ini untuk analisis nitrat pada air dengan konsentrasi rendah karena sensitivitas dan kesederhanaannya. Untuk menghasilkan data analisis yang akurat dan dapat dipercaya serta dapat dipertanggungjawabkan, harus didukung oleh SDM yang kompeten, peralatan dan instrumen yang terkalibrasi, bahan kimia yang memenuhi standar pengujian (bersertifikat/CRM), dan metode uji sesuai SNI atau standar yang telah tervalidasi (sesuai ketentuan akreditasi laboratorium yaitu SNI ISO/IEC 17025:2017). Metode uji nitrat yang digunakan di Laboratorium Analitik mengacu pada SNI [4], namun terdapat modifikasi pada volume sampel dan pereaksi guna menyesuaikan dengan kondisi operasional di laboratorium. Oleh karena itu, metode tersebut harus divalidasi kembali sesuai syarat keberterimaan agar tetap sah digunakan termasuk untuk memastikan bahan kimia non-CRM yang digunakan tetap layak dan memenuhi persyaratan metode.

2 PERCOBAAN

2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dipergunakan pada penelitian ini adalah gelas beker, neraca analitik, lemari asam, vortex, pipet volume, pipet ukur, labu ukur, pipet tetes, batang pengaduk, ball filler, spatula, botol, tabung reaksi, kuvet, dan Spektrofotometer UV-Vis 2600 Shimadzu. Bahan yang diperlukan untuk penelitian ini adalah KNO_3 , Brusin-Sulfat, Asam Sulfanilik,

Asam Sulfat pekat, NaCl, akuades, dan kertas saring.

2.2 Metode

Pembuatan Larutan Induk Nitrat 100 mg/L

Sebanyak 0,7218 gram KNO_3 di timbang teliti, kemudian dilarutkan dengan akuades menjadi 1 liter.

Pembuatan Variasi Larutan Standar Nitrat

Pembuatan larutan standar menjadi konsentrasi rendah dilakukan secara bertahap. Larutan induk diencerkan terlebih dahulu menjadi 10 mg/L, lalu 2 mg/L. Selanjutnya diencerkan menjadi variasi konsentrasi 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3; 1,5; 1,7 dan 1,9 mg/L. Larutan standar dibuat sebanyak 8 kali untuk tiap konsentrasi [5].

Preparasi Larutan Standar Nitrat

Akuades sebagai blanko dan variasi larutan standar yang telah dibuat, masing-masing dipipet sebanyak 2,5 mL pada tabung reaksi yang diletakkan pada rak berisi air dingin, lalu ditambahkan 0,5 mL larutan NaCl 30%, dan dikocok dengan vorteks. Ditambahkan 2,5 mL larutan asam sulfat 75%, lalu dikocok dengan vorteks, dan diamkan sampai larutan dalam tabung reaksi menjadi dingin. Ditambahkan 0,125 mL larutan Brusin-Asam Sulfanilik, lalu kocok dengan vorteks. Selanjutnya dipanaskan pada penangas air dengan temperatur lebih besar atau sama dengan 95°C selama 20 menit. Setelahnya tabung reaksi diletakkan pada wadah berisi air dingin hingga mendekati suhu kamar, lalu tabung-tabung dikeringkan dengan tisu, dan siap dibaca pada alat.

Pengujian Larutan Standar Nitrat

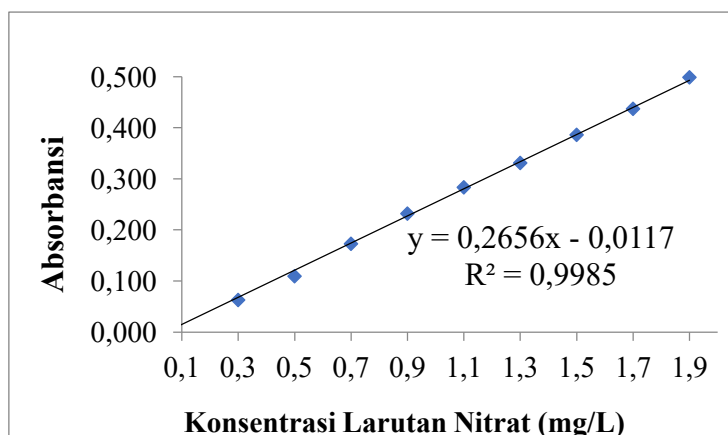
Larutan blanko dan standar yang telah dipreparasi selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis 2600 pada panjang gelombang maksimum. Persamaan regresi linier untuk masing-masing standar kemudian ditentukan, dan data absorbansi

yang diperoleh diolah lebih lanjut untuk mengevaluasi parameter linieritas, akurasi, presisi, LOD, dan LOQ sebagai bagian dari persyaratan validasi metode.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi merupakan proses pemeriksaan yang menggunakan bukti pengujian untuk memastikan kesesuaian dengan tujuan uji. Validasi wajib dilakukan terhadap metode yang belum memenuhi standar, serta terhadap metode yang sedang maupun telah dikembangkan [6]. Apabila acuan parameter memenuhi persyaratan validasi, maka metode analisis yang digunakan dapat dipercaya dan dapat dipertanggungjawabkan kebenarannya [7]. Metode yang digunakan dalam analisis nitrat adalah metode Brusin. Prinsip metode ini adalah bahwa ion nitrat bereaksi dengan brusin dalam kondisi asam menghasilkan senyawa berwarna kuning. Intensitas warna yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh yakni 410 nm. Laju reaksi antara brusin dan ion nitrat sangat dipengaruhi oleh panas yang dihasilkan selama reaksi berlangsung. Oleh karena itu, suhu reaksi harus dijaga konstan dengan cara menginkubasi campuran pereaksi pada waktu dan temperatur yang tepat [8]. Metode ini dapat digunakan untuk menganalisis sampel air dengan salinitas yang bervariasi, mulai dari air tawar hingga air laut, dan direkomendasikan untuk air dengan kandungan $\text{NO}_3\text{-N}$ berkisar antara 0,1 hingga 2,0 mg/L [8].

Variasi larutan standar dibuat sebanyak delapan kali, dan masing-masing diukur pada panjang gelombang 410 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setelah data diperoleh, dilakukan tahap seleksi data dengan menggunakan perhitungan batas kepercayaan sebagai dasar untuk mengeliminasi data yang menyimpang. Tahap ini bertujuan untuk menilai seberapa jauh perbedaan antara nilai rata-rata kumpulan data dengan nilai yang diduga menyimpang. Berdasarkan



Gambar 1. Perbandingan Absorbansi dan Konsentrasi Larutan Standar Nitrat dalam Kurva Kalibrasi

hasil pengukuran tersebut, dapat ditentukan apakah data yang berpotensi menyimpang masih dapat dipertahankan atau perlu dihapus sebelum dilakukan perhitungan selanjutnya.

Linieritas

Uji linieritas dilakukan untuk menilai kemampuan metode analisis dalam menghasilkan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit, baik secara langsung maupun melalui transformasi matematis. Penentuan linieritas bertujuan memastikan keakuratan rentang kerja metode, yang ditentukan dengan membuat kurva kalibrasi dari serangkaian larutan standar dengan konsentrasi yang telah diketahui. Selanjutnya menjadi dasar perhitungan persamaan regresi dan koefisien korelasi (r). Nilai koefisien korelasi yang mendekati 1 menunjukkan hubungan yang sangat kuat antara konsentrasi dan respon instrumen. Dari pengukuran absorbansi terhadap variasi larutan standar, diperoleh kurva kalibrasi seperti pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh persamaan regresi $y = 0,2656x - 0,0117$ dengan nilai $R^2 = 0,9985$, sehingga nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9992. Hal ini menunjukkan hubungan linier yang

sangat kuat antara konsentrasi nitrat dan respon absorbansi instrumen. Hasil ini sebanding dengan penelitian spektrofotometer UV-Vis terkini untuk analisis nitrat yang melaporkan nilai $R^2 \geq 0,998$ sebagai kriteria linieritas yang dapat diterima dalam validasi metode analitik [9, 10]. Hal ini mengindikasikan bahwa metode Brusin Sulfat yang digunakan memiliki rentang kerja yang sesuai untuk analisis nitrat pada konsentrasi rendah. Dengan demikian, uji linieritas pada penelitian ini memenuhi kriteria dan dinyatakan linier.

Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi (LOD) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat terdeteksi dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Berdasarkan perhitungan teoritis, nilai LOD diperoleh sebesar 0,0778 mg/L. Sementara itu, batas kuantitasi (LOQ) merupakan konsentrasi analit terendah yang masih dapat ditentukan secara seksama dan cermat, dengan nilai diperoleh sebesar 0,2594 mg/L. Perhitungan LOD dan LOQ dilakukan menggunakan persamaan regresi $y = bx + a$, dimana nilai pengukuran identik dengan nilai b pada persamaan tersebut,

Tabel 1. Hasil % *Recovery* pada Uji Akurasi

Konsentrasi									
Larutan Nitrat (mg/L)	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5	1,7	1,9
% <i>Recovery</i>	93,44	91,14	99,21	101,87	100,95	99,25	99,82	99,38	101,12

Tabel 2. Hasil % RSD dan Nilai 2/3 CV Horwitz pada Uji Presisi

Konsentrasi									
Larutan Nitrat (mg/L)	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5	1,7	1,9
% RSD	2,01	1,86	1,85	2,95	1,09	3,53	0,87	1,31	3,56
2/3 CV Horwitz	12,92	12,01	11,27	10,81	10,50	10,27	10,04	9,86	9,67

dan simpangan baku blanko dianggap sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh menggambarkan kemampuan alat dalam mendeteksi dan mengukur analit pada konsentrasi rendah. Apabila konsentrasi analit (nitrat) melebihi nilai LOD, maka sinyal yang dihasilkan dapat dianggap sebagai respon instrumen yang valid terhadap analit. Sebaliknya, bila konsentrasi berada di bawah nilai LOD, sinyal tersebut dianggap sebagai noise dan tidak dapat dipercaya. Nilai LOQ menunjukkan batas kuantitasi terkecil yang dapat ditentukan secara andal, sekaligus menjadi dasar penetapan rentang kerja metode. Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh secara teoritis kemudian dikonfirmasi secara eksperimental dengan mengukur larutan standar nitrat pada konsentrasi setara dengan nilai LOD dan LOQ hasil perhitungan. Delapan kali pengulangan dilakukan terhadap larutan tersebut, dan seluruh hasil pengukuran menunjukkan respon positif. Nilai batas deteksi (LOD) sebesar 0,0778 mg/L dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 0,2594

mg/L menunjukkan bahwa metode ini memiliki sensitivitas yang memadai untuk analisis nitrat dalam air. Nilai tersebut berada dalam kisaran yang sebanding dengan metode spektrofotometri UV-Vis lain yang divalidasi untuk penentuan nitrat, dengan LOD dilaporkan berkisar antara 0,05-0,56 mg/L dan LOQ antara 0,17-1,70 mg/L tergantung pada pendekatan analisis dan matriks sampel [9, 10, 11]. Dengan demikian, nilai LOD dan LOQ yang diperoleh dapat dilaporkan terkonfirmasi dan valid.

Akurasi

Akurasi merupakan parameter yang menunjukkan tingkat kedekatan hasil pengukuran analit terhadap nilai sebenarnya. Nilai akurasi dinyatakan dalam bentuk persentase perolehan kembali (*recovery*). Hasil pengujian yang disajikan pada Tabel 1. menunjukkan bahwa nilai % *recovery* untuk seluruh konsentrasi standar berada dalam rentang 90-110%, sesuai dengan kriteria keberterimaan metode analisis kuantitatif. Rentang *recovery* ini konsisten dengan penelitian terbaru yang

melaporkan akurasi analisis nitrat menggunakan spektrofotometer UV-Vis berada pada kisaran 88-105%, sehingga metode yang digunakan dalam penelitian ini dapat dikategorikan akurat dan andal [9].

Presisi

Presisi merupakan parameter yang menunjukkan tingkat kedekatan antara hasil pengukuran individual dari serangkaian pengulangan terhadap nilai sebenarnya. Uji presisi digunakan untuk menilai adanya kesalahan acak pada suatu metode. Kesalahan acak sulit dihindari dalam kegiatan laboratorium karena dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti kondisi lingkungan, prosedur kerja, alat ukur, serta karakteristik sampel yang dianalisis. Presisi dinyatakan dalam bentuk simpangan baku (SD) atau simpangan baku relatif (RSD). Berdasarkan Tabel 2., presisi metode yang dievaluasi berdasarkan nilai persen simpangan baku relatif (% RSD) menunjukkan hasil $\leq 2/3$ CV Horwitz, yang mengindikasikan tingkat keterulangan pengukuran yang baik sehingga metode dapat dinyatakan presisi. Hasil ini sejalan dengan laporan penelitian lain yang menyatakan bahwa metode spektrofotometer UV-Vis untuk nitrat memiliki presisi yang baik dengan nilai % RSD umumnya $< 2\%$ pada kondisi *repeatability* [9, 12].

Secara keseluruhan, hasil validasi metode dalam penelitian ini menunjukkan bahwa metode Brusin Sulfat yang dimodifikasi memenuhi seluruh parameter validasi utama, yaitu linieritas, sensitivitas (LOD dan LOQ), akurasi, dan presisi. Dengan demikian, metode ini dapat dinyatakan layak dan valid untuk digunakan sebagai metode rutin analisis nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$) di Laboratorium Analitik UPT Laboratorium Terpadu Universitas Udayana.

4 KESIMPULAN

Hasil validasi metode menunjukkan bahwa persamaan regresi menghasilkan nilai $r = 0,9992$, yang menandakan hubungan linier yang sangat baik antara konsentrasi dan respon instrumen. Nilai persen recovery berada dalam rentang 90-110%, sesuai dengan kriteria keberterimaan, sehingga metode dinyatakan akurat. Nilai persen RSD $\leq 2/3$ CV Horwitz menunjukkan bahwa metode memiliki presisi yang baik. Sementara itu, nilai LOD sebesar 0,0778 mg/L dan LOQ sebesar 0,2594 mg/L telah terkonfirmasi secara eksperimental. Dengan terpenuhinya seluruh parameter tersebut, dapat disimpulkan bahwa metode uji nitrat valid dan layak digunakan di Laboratorium Analitik UPT Laboratorium Terpadu sebagai metode analisis yang andal, akurat, dan dapat dipertanggungjawabkan.

5 UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Udayana atas dukungan pendanaan melalui Hibah Pranata Laboratorium yang bersumber DIPA PNBP Universitas Udayana Tahun Anggaran 2025, berdasarkan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Penelitian Nomor : B/229.218/UN14.4.A/PT.01.03/2025, tanggal 28 April 2025.

6 REFERENSI

- [1] Ward, M. H., Jones, R. R., Brender, J. D., de Kok, T. M., Weyer, P. J., Nolan, B. T., Villanueva, C. M., & van Breda, S. G., 2018, Drinking water nitrate and human health: An updated review, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), 1557.
- [2] World Health Organization, 2022, *Guidelines for drinking-water quality (4th ed., incorporating the 1st and 2nd addenda)*, WHO Press.
- [3] Temkin, A., Evans, S., Manidis, T., Campbell, C., Naidenko, O. V., 2019,

- Exposure-based assessment and economic valuation of adverse birth outcomes and cancer risk due to nitrate in United States drinking water, *Environmental Research*, 176, 108442.
- [4] Badan Standarisasi Nasional, 1991, SNI 06-2480-1991, *Metode Pengujian Kadar Nitrat dalam Air dengan Alat Spektrofotometer Secara Brusin Sulfat*, Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- [5] Lab Mania, 2019, *Modul Workshop Validasi dan Verifikasi Metode*, Bekasi: Lab Mania.
- [6] Riyanto, 2014, *Validasi dan Verifikasi Metode Uji*, Yogyakarta: Penerbit Deepublish.
- [7] Taufiq, M., Sabarudin. A., dan Mulyasuryani, A., 2016, Pengembangan dan Validasi Metode Destruksi Gelombang Mikro untuk Penentuan Logam Berat Kadmium dan Timbal dalam Cokelat dengan Spektroskopi Serapan Atom (SSA), *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 5(2), 31–37.
- [8] Husin, Y. A., 1988, *Penuntun Analisis Sifat Fisik – Kimia Air*, Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [9] Ribeiro, B. G., David, P. R. B. S., Daltro, T. P. P., Charamba, L. V. C., Andrade, M. F., Napoleao, D. C., 2018, Performance verification of methodology for determination of nitrate ion in drinking water samples by UV spectrophotometry, *Rev Eletron Gest Educ Tecnol Ambient*, 22, 1–10.
- [10] Silva, M. F., Bermejo de Lima, L., & Telles Benatti, C., 2024, Usability of simplified UV–Vis spectrophotometric methods for the determination of nitrate in the presence of organic matter and chloride as interfering factors, *Water Practice & Technology*, 19(3), 1061–1070.
- [11] Guimaraes, V., & Azenha, M., 2014, Detailed validation of a method for the determination of nitrate in water by UV/Vis spectroscopy, *Journal of AOAC International*, 97(1), 195–201.
- [12] Magnusson, B., & Ornemark, U., 2019, *Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics (2nd ed.)*, Swedia: Eurachem.