

## ANALISIS CHLORAMPHENICOL PADA UDANG WINDU (*PENAEUS MONODON*) SECARA SPEKTROFOTOMETRI BERBASIS REAKSI DIAZOTASI

### SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF CHLORAMPHENICOL IN TIGER PRAWNS (*PENAEUS MONODON*) BASED ON THE DIAZOTATION REACTION

Moh. Syaiful Arif \*, Indra Kurniawan<sup>2</sup>, Bohari Yusuf

Program Studi S1 Kimia, FMIPA, Universitas Mulawarman  
Jalan Barong tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua, Samarinda-Indonesia  
\*Corresponding Author : [syaifularif88@gmail.com](mailto:syaifularif88@gmail.com)

Submitted : 02 Agustus 2021

Accepted : 07 Maret 2023

Publish : 15 Mei 2023

#### ABSTRACT

Spectrophotometric analysis of chloramphenicol in tiger prawns (*Penaeus Monodon*) based on the diazotation reaction has been carried out. Sulfanilamide is used as a source of diazo salt to be coupled with chloramphenicol. In this study, several optimizations were carried out such as optimization of temperature, volume of HCl, volume of NaNO<sub>2</sub>, volume of sulfanilamide and contact time. Diazonium salt coupled with sulfanilamide produces a clear yellow compound with a maximum wavelength of 400.941 nm. The results of the analysis chloramphenicol on tiger shrimp, obtained the coefficient of variation were 4.026 %; 1.951 %; and 4.277 %.. Accuracy ranges from 99.7143% to 100.8730%. The Limit of Detection value is 6.24 mg/mL and the Limit of Quantization value was 20.803 mg/mL. The sensitivity value is 0.0021 mL / $\mu$ g.

**Keywords :** *Tiger prawns, chloramphenicol and reaction diazotation.*

#### ABSTRAK

Analisis *chloramphenicol* pada udang windu (*Penaeus Monodon*) secara spektrofotometri berbasis reaksi diazotasi telah dilakukan. Sulfanilamid digunakan sebagai sumber garam diazo yang akan dikopling dengan *chloramphenicol*. Pada penelitian ini dilakukan beberapa optimasi seperti optimasi suhu, volume HCl, volume NaNO<sub>2</sub>, volume sulfanilamid dan waktu kontak. Garam diazonium yang dikopling dengan sulfanilamid menghasilkan menghasilkan senyawa l berwarna kuning jernih dengan panjang gelombang maksimum 400,941 nm. Hasil pengujian *chloramphenicol* pada udang windu, diperoleh nilai koefisien variasi sebesar 4,026 %; 1,950 %; dan 4,277 %. Nilai akurasi pada rentang 99,7143% sampai 100,8730%. Nilai limit deteksi sebesar 6,24  $\mu$ g/mL dan nilai limit kuantisasi sebesar 20,803  $\mu$ g/mL. Nilai sensitivitas sebesar 0,0021 mL/ $\mu$ g.

**Kata kunci :** *udang windu, chloramphenicol dan reaksi diazotasi.*



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

## PENDAHULUAN

Negara Indonesia yang merupakan negara maritim membuat sebagian masyarakatnya bermata pencaharian sebagai nelayan ataupun budidaya, salah satu budidaya yang banyak dikembangkan ialah udang windu. Budidaya udang windu mulai berkembang sebagai suatu usaha industri sejak tahun 1980-an, namun pemanfaatannya masih sering mengalami berbagai kendala terutama yang disebabkan oleh serangan organisme patogen sehingga mengakibatkan menurunnya produksi, baik pada usaha pembenihan maupun pada usaha pembesaran di tambak [1]. Dalam rangka mengendalikan penyakit udang terutama yang disebabkan oleh bakteri, maka petambak seringkali menggunakan antibiotik seperti *chloramphenicol* yang terkadang dicampurkan ke dalam pakan.

*Chloramphenicol* merupakan antibiotika golongan *amphenicol* yang bersifat bakteriostatik, selain itu *chloramphenicol* juga memiliki aktifitas spektrum luas aktif terhadap bakteri yang patogen. Selain digunakan untuk pengobatan, *chloramphenicol* juga digunakan pada pembilasan kolam dalam proses produksi dan sebagai desinfektan sebelum produk tersebut diproses lebih lanjut [2]. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat berpotensi menyebabkan residu dalam jaringan organ ternak hewan. Hal ini tentu cukup berbahaya bagi kesehatan manusia yang mengkonsumsinya, karena dapat menimbulkan reaksi alergi, keracunan bahkan resistensi jika dikonsumsi dalam jumlah besar dan jangka waktu yang lama, sehingga antibiotik tidak boleh ditambahkan pada pakan buatan untuk hewan ternak [3].

Batasan konsentrasi yang dianjurkan oleh Pemerintah *United Kingdom* tentang residu *chloramphenicol* dalam bahan makanan adalah dibawah 10 ppb. Sedangkan ambang batas konsentrasi *chloramphenicol* di dalam tubuh hewan yang masih diperbolehkan yaitu sebesar 0,3 ppb [4]. Lebih daripada itu maka hewan tidak boleh dikonsumsi karena akan memberikan dampak berbahaya bagi kesehatan manusia. Dampak negatif yang ditimbulkan *chloramphenicol* dalam jangka waktu yang lama dan berlebihan kadarnya dapat mengakibatkan depresi sumsum tulang belakang, yang menimbulkan kelainan darah yang serius, seperti anemia aplastik, granulositopenia, dan trombositopenia. Selain itu, obat ini juga dapat menyebabkan gangguan saluran cerna dan reaksi hipersensitivitas [5].

Berdasarkan pemaparan diatas, maka perlu dilakukan analisa *chloramphenicol* pada udang windu yang akan dijual ke konsumen dengan metode yang cepat, mudah dan murah sehingga diketahui kadar *chloramphenicol* pada udang windu yang akan dipasarkan.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, neraca analitik, spektrofotometer UV-Vis *evolution 201*, *Hotplate stirer*, sentrifuse, pipet ukur, pipet volume, labu ukur, gelas kimia, labu erlenmeyer, gelas arloji, corong gelas, spatula, pipet tetes, batang pengaduk, dan botol semprot.

### Bahan

Semua reagen yang digunakan dalam penelitian ini berderajat pro analisis. Adapun bahan yang digunakan antara dalam penelitian ini adalah, *chloramphenicol* (Merck), sulfanilamid (Merck), natrium nitrit (Merck), asam klorida pekat (Merck), garam dan es batu.

### Prosedur Penelitian

#### Larutan induk *chloramphenicol* 1000 ppm

Ditimbang 0,01 gram *chloramphenicol* kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 50 mL, ditambahkan etanol dan diaduk hingga larut. kemudian larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan etanol sampai tanda tera dan dikocok hingga homogen.

#### Larutan asam sulfanilamid 0,3%

Ditimbang 0,3 gram sulfanilamid kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL dan dilarutkan dengan aquades. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan aquades sampai tanda tera dan dikocok hingga homogen.

#### Larutan natrium nitrit 1%

Ditimbang 1,0 gram natrium nitrit kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 50 mL, dilarutkan dengan 40

mL aquades dan diaduk sampai natrium nitrit larut. Selanjutnya larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan aquades sampai tanda tera dan dikocok hingga homogen.

#### **Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%**

Ditimbang 1,0 gram asam trikloroasetat kemudian dilarutkan dengan aquades, kemudian dipindahkan ke labu takar 10 mL, diencerkan hingga tanda tera dan dikocok dan dihomogenkan.

#### **Larutan HCl 1,0 M**

Sebanyak 8,3 mL asam klorida pekat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan dengan aquades hingga tanda tera dan dikocok hingga homogen. Larutan HCl 0,1 M dibuat dengan mengencerkan dari larutan HCl 1,0 M.

#### **Panjang gelombang maksimum *chloramphenicol***

Pengukuran panjang gelombang maksimum *chloramphenicol* dilakukan dengan menyiapkan larutan *chloramphenicol* 100 ppm. Kemudian larutan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada daerah panjang gelombang UV 200-400 nm menggunakan blanko etanol.

#### **Panjang gelombang maksimum senyawa azo sulfanilamid-CAP**

Diambil 3,0 mL larutan sulfanilamid 0,3 % dimasukkan ke dalam gelas kimia 50 mL. Selanjutnya ditambahkan berturut-turut larutan 3,0 mL HCl 0,1 M dan 6,0 mL NaNO<sub>2</sub> 1%. Larutan dicampur dengan baik dan dibiarkan pada suhu kamar selama 3 menit agar terjadi reaksi diazotasi. Selanjutnya larutan ditambahkan 2,0 mL *chloramphenicol* 500 µg/mL dan diaduk selama 6 menit dalam suhu dingin. Senyawa azo yang dihasilkan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan aquades sampai tanda tera kemudian diukur panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada daerah tampak 380 – 700 nm. Blanko yang digunakan adalah reagen yang terdiri dari sulfanilamid, HCl, NaNO<sub>2</sub>, tanpa *chloramphenicol*. Panjang gelombang yang menghasilkan nilai serapan maksimum merupakan panjang gelombang maksimum dari senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol*.

#### **Pembuatan Kurva Kalibrasi**

Disiapkan 7 buah gelas kimia 50 mL masing masing dimasukkan 3 mL larutan sulfanilamid 0,3%. Kemudian ditambahkan 3 mL larutan HCl 0,1 M dan 6 mL larutan NaNO<sub>2</sub> 1%. Kemudian larutan diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 3 menit pada suhu dingin. Selanjutnya masing-masing ditambahkan 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 dan 4,0 mL *chloramphenicol* 500 µg/mL kemudian diaduk selama 8 menit. selanjutnya diencerkan dalam labu takar 25 mL dan dihomogenkan sehingga diperoleh konsentrasi *chloramphenicol* 20 µg/mL; 30 µg/mL; 40 µg/mL; 50 µg/mL; 60 µg/mL; 70 µg/mL dan 80 µg/mL. Lalu diukur absorbansi panjang masing-masing larutan dengan variasi volume tersebut menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum senyawa azo Sulfanilamid-*Chloramphenicol*.

#### **Analisis *chloramphenicol* dalam udang dengan metode adisi standar**

Analisis *chloramphenicol* dalam sampel udang dengan metode adisi dilakukan dengan menghaluskan udang yang tidak mengandung *chloramphenicol* dengan alu dan lumpang, kemudian diambil 5 gram udang, kemudian ditambahkan etanol kemudian disaring. Kemudian dipindahkan ke dalam tiga tabung sentrifugasi lalu ditambahkan larutan TCA 10% dengan perbandingan 1:1 dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 8 menit. Terbentuk 2 fase, diambil dan dipindahkan fase atas ke dalam gelas kimia. kemudian ditambahkan larutan *chloramphenicol* dengan konsentrasi 20 µg/mL, 50 µg/mL, dan 80 µg/mL. Kemudian digunakan untuk reaksi kopling dengan sumber garam diazonium yang telah dibuat sebelumnya sesuai prosedur pada kondisi optimum percobaan. Senyawa azo yang dihasilkan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 25 mL ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen. Masing-masing larutan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum menggunakan larutan blanko reagen dengan udang tanpa *chloramphenicol*. Kemudian dilakukan perhitungan *recovery* untuk masing-masing *chloramphenicol* yang ditambahkan.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

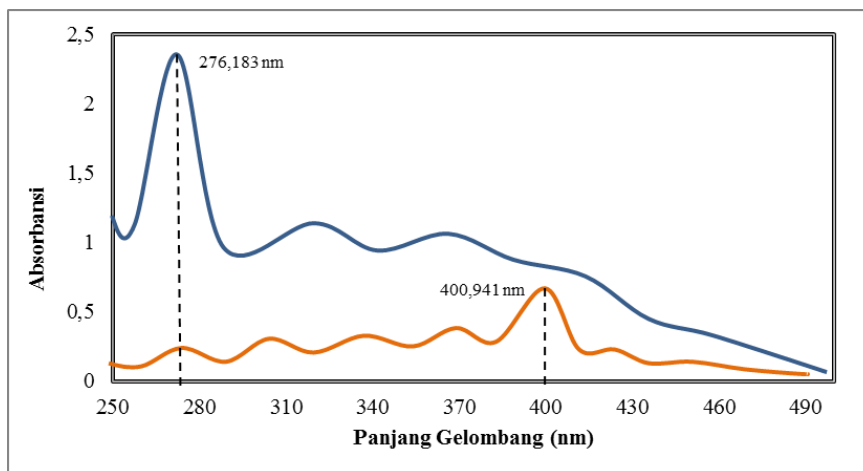
### **Penentuan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol***

Pada spektra hasil pengukuran didapatkan panjang gelombang maksimum *chloramphenicol* pada rentang panjang gelombang sinar UV yaitu 276,183 nm. Aisha [6] melakukan penentuan panjang gelombang maksimum

*chloramphenicol* dimana diperoleh panjang gelombang yaitu 278 nm dimana hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan hasil penentuan panjang gelombang *maksimum chloramphenicol* yang telah dilakukan.

### Penentuan panjang gelombang maksimum senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol*

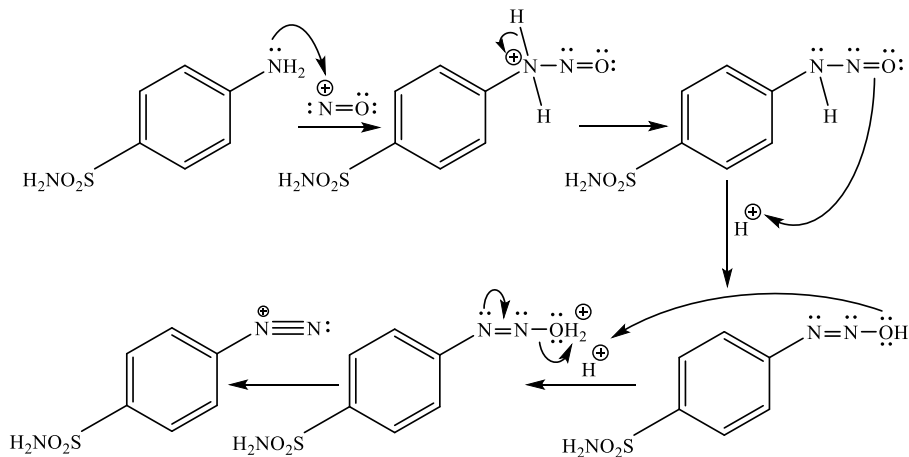
Pada Penentuan panjang gelombang maksimum senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol* diperoleh panjang gelombang yaitu 400,941 nm.



**Gambar 1.** Panjang gelombang maksimum *chloramphenicol*, dan senyawa Azo sulfanilamid-*chloramphenicol*

Pada pembentukan senyawa azo sulfanilamid-*chloramphenicol* terjadi dua tahapan reaksi. Pada tahap pertama yaitu reaksi diazotasi sulfanilamid pada saat direaksikan dengan HCl dan NaNO<sub>2</sub>, reaksi ini terjadi disebabkan pada sulfanilamid memiliki gugus amina primer pada cincin aromatisnya, dimana akan bereaksi dengan asam nitrat melalui ion nitrosonium.

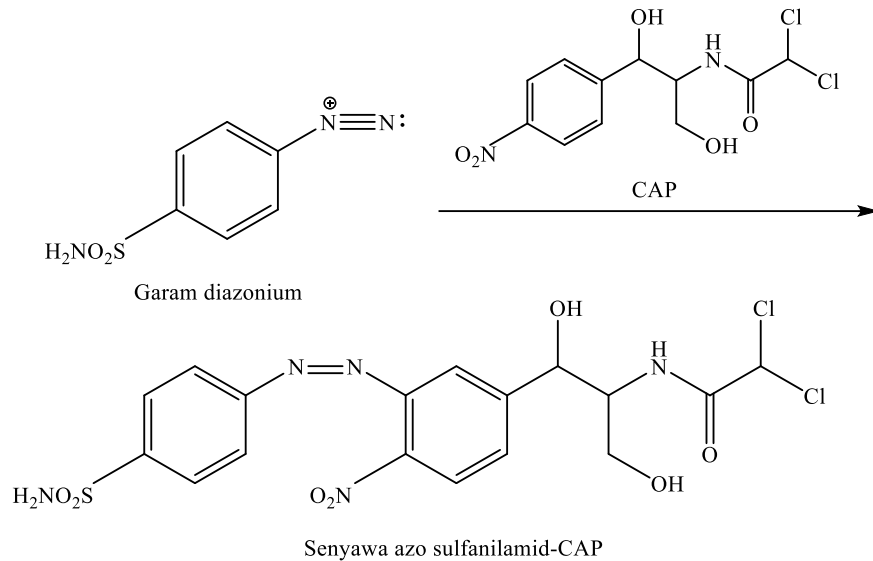
#### Tahap 1



**Gambar 2.** Reaksi pembentukan garam diazonium

Pada tahap kedua terjadi reaksi kopling, garam diazonium bertindak sebagai elektrofil lemah yang akan menyerang *chloramphenicol* yang bersifat nukleofilik. Dimana garam diazonium akan terikat pada posisi meta karena disebabkan adanya efek sterik dimana gugus 2,2-dichloro-N-(1,3-dihydroxybutan-2-yl)acetamide memiliki bobot yang lebih besar daripada gugus NO<sub>2</sub> sehingga senyawa azo Sulfanilamid-*chloramphenicol* dapat terbentuk.

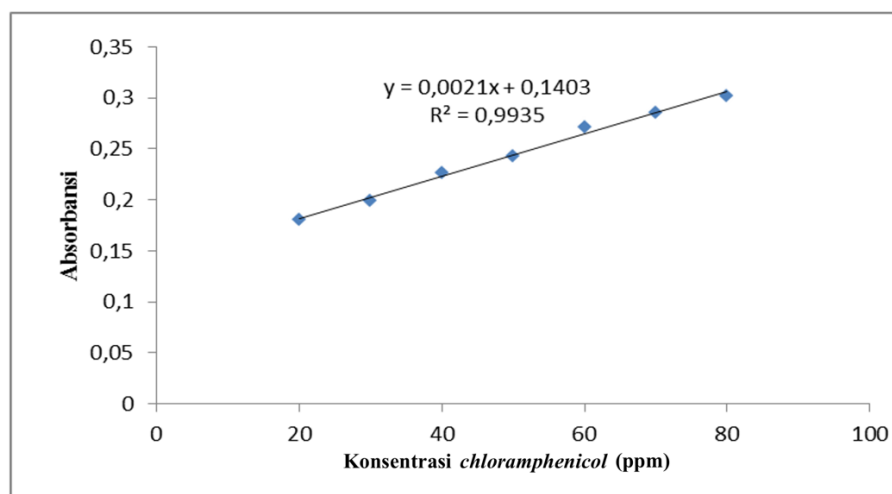
Tahap 2



**Gambar 3.** Reaksi kopling garam diazonium dengan *chloramphenicol*

**Pembuatan kurva kalibrasi**

Pada penentuan kurva kalibrasi dilakukan pengukuran konsentrasi *chloramphenicol* dengan variasi yang berbeda yaitu 20-80 g/mL. Dari hasil pengukuran yang dilakukan, didapatkan persamaan regresi linear  $y = 0,0021x + 0,1403$ , dimana  $y$  sebagai absorbansi dan  $x$  sebagai konsentrasi CAP. Adapun nilai koefisien korelasi dari persamaan regresi linear yaitu  $R^2 = 0,9935$  dan terlihat bahwa kurva kalibrasi yang dihasilkan menunjukkan linearitas. Dimana jika koefisien determinasi ( $R$ ) semakin mendekati 1 maka kurva tersebut memiliki linearitas yang baik [7].



**Gambar 4.** Kurva Kalibrasi *chloramphenicol*

Tabel 1. Karakteristik metode penentuan *chloramphenicol*

Parameter	Nilai
Jenis metode	Kopling azo
Reagen sumber garam diazonium	Sulfanilamid
Panjang gelombang maksimum, $\lambda_{max}$ (nm)	400,941 nm
Warna senyawa azo	Kuning jernih
Rentang Hukum Beer ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	20 – 80
Absorptivitas molar ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	1779,8807

Sensitivitas Sandell's ( $\mu\text{g cm}^{-2} / 0,001$ unit absorbansi)	0,1966
<b>Persamaan regresi (<math>y = bx + a</math>)</b>	
Slop (b)	0,0021
Intersep (a)	0,1403
Koefisien korelasi (r)	0,9967

### Linearitas

Penentuan linearitas ditentukan dari persamaan regresi linear kurva kalibrasi. Berdasarkan kuva tersebut diperoleh nilai serapan meningkat secara linear seiring dengan meningkatnya konsentrasi *chloramphenicol* yang diberikan. Hubungan linear yang terjadi menunjukkan bahwa nilai serapan berbanding lurus dengan kadar *chloramphenicol* pada batas Hukum Beer dalam rentang 20-80  $\mu\text{g/mL}$ . Linearitas didapat dari harga koefisien regresi ( $R^2$ ) yang diperoleh dari persamaan regresi linear. Berdasarkan perhitungan diperoleh koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,9967 dan berdasarkan uji t diperoleh  $t_{\text{hit}} > t_{\text{tabel}}$ . Keduanya menggambarkan terdapat korelasi linear antara konsentrasi *chloramphenicol* dengan nilai serapan. Koefisien korelasi diperoleh 0,9967, artinya 99,67% perubahan nilai serapan dipengaruhi oleh konsentrasi *chloramphenicol*.

### Sensitivitas

Sensitivitas suatu metode ditentukan berdasarkan harga kemiringan (*slope*) dari persamaan regresi linier kurva kalibrasi [8]. Semakin besar nilai *slope* menunjukkan perubahan konsentrasi analit yang sedikit akan memberi perubahan serapan yang besar, sehingga sensitivitas metode dikatakan baik [9]. Berdasarkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi diperoleh nilai sensitivitas 0,0021  $\text{mL}/\mu\text{g}$ . Nilai tersebut menunjukkan bahwa dengan perubahan konsentrasi *chloramphenicol* sebesar 10,0  $\mu\text{g/mL}$  akan menghasilkan perubahan serapan sebesar 0,0021. Berdasarkan nilai sensitivitas tersebut dapat dikatakan metode yang diusulkan memiliki sensitivitas yang cukup baik. Hal ini didukung dengan perolehan absorptivitas molar yang tinggi sebesar 1779,8807  $\text{L/mol cm}$ .

### Presisi

Presisi atau ketelitian adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Perhitungan nilai presisi ditentukan melalui koefisien variasi (KV) yang diperoleh dari proses pengukuran yang dilakukan secara berulang. Pada penelitian ini untuk mengetahui presisi dari metode yang diusulkan sesuai hasil optimasi sebelumnya, dilakukan pengukuran pada tiga konsentrasi berbeda dengan tiga kali pengulangan. Penentuan presisi diambil dari data konsentrasi *chloramphenicol* 20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$  dan 70  $\mu\text{g/mL}$ . Dari hasil perhitungan diperoleh nilai koefisien variasi pada konsentrasi *chloramphenicol* 20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , dan 70  $\mu\text{g/mL}$  berturut-turut adalah 4,0269%, 1,9509 % dan 4,2771 %. Sedangkan koefisien variasi rata-rata perhitungan diperoleh 3,4183 %.

### Limit deteksi

Limit deteksi atau *limits of detection* (LOD) menyatakan jumlah terkecil analit yang masih dapat memberikan sinyal yang dapat ditangkap oleh detektor. Sedangkan limit kuantitas atau *limits of quantitation* (LOQ) merupakan konsentrasi terkecil dari suatu sampel yang dianalisis dengan penentuan kuantitatif dapat menunjukkan hasil yang teliti. Semakin kecil nilai limit deteksi suatu metode, maka semakin baik pula metode tersebut dalam mendeteksi suatu analit. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh limit deteksi dan limit kuantifikasi masing-masing adalah 6,2411  $\mu\text{g/mL}$  dan 20,8036  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai tersebut merupakan batas terkecil dari konsentrasi *chloramphenicol* yang masih dapat dianalisis secara spektrofotometri berbasis reaksi diazotasi.

### Akurasi Metode pada udang windu dengan Metode Adisi Standar

Data akurasi lebih lanjut dipastikan dengan melakukan percobaan *recovery* pada tiga konsentrasi *chloramphenicol* yang berbeda menggunakan metode adisi standar. Konsentrasi *chloramphenicol* yang ditambahkan masing-masing 20  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  dan 80  $\mu\text{g/mL}$ . Metode adisi standar diaplikasikan pada penentuan *chloramphenicol* dalam diselidiki untuk membuktikan bahwa metode yang diusulkan tidak terpengaruh oleh matriks sampel.

**Tabel 2.** Tabel hasil perhitungan *recovery*

<i>Chloramphenicol</i> ditambahkan ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Chloramphenicol</i> yang diperoleh ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Recovery</i> (%) (n =3)
20	20,1746	100,8730
50	49,8571	99,7143
80	80,3333	100,4167
<b>Rerata</b>		<b>100,3347</b>

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian pada penentuan *chloramphenicol* dengan metode adisi standar pada konsentrasi *chloramphenicol* 20  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  dan 80  $\mu\text{g/mL}$ . Pada *recovery* diperoleh masing-masing adalah 100,8730%, 99,7143% dan 100,4167%. Sedangkan *recovery* rata-ratanya adalah 100,3347%. Pada nilai koefisien variasi diperoleh berturut-turut adalah 4,0269 %, 1,9509 % dan 4,2771 %. Sedangkan koefisien variasi rata-rata perhitungan diperoleh 3,4183 %. Dengan nilai LOD dan LOQ masing-masing sebesar 6,2411  $\mu\text{g/mL}$  dan 20,8036  $\mu\text{g/mL}$ . Serta nilai sensitivitas sebesar 0,0021 mL/ $\mu\text{g}$  dengan perolehan absorptivitas molar sebesar 1779,8807 L/mol cm. Metode ini dapat digunakan pada sampel yang memiliki konsentrasi diatas 6,2411 ppm, jika diatas konsentrasi tersebut metode ini tidak dianjurkan ataupun direkomendasikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Atmomarsono, M., M. I. Madeali., A. Tompo., dan Muliani. 2000. *Teknologi Budidaya Udang Berkelanjutan. Balai Penelitian Perikanan Pantai Maros. Makalah pada Konferensi Nasional II Pengelolaaan Sumberdaya Pesisir dan lautan Indonesia*, Makassar 15-17 Mei 2000.
- [2] Wahab, Abdul dan Lestari, Lies Amin. 1999. *Menulis Karya Ilmiah*. Surabaya: Airlangga University Press.
- [3] Yuningsih., Murdiati, T. B., & Juariah, S. 2005. Keberadaan Residu Antibiotik Tilosin (golongan makrolida) Dalam Daging Ayam Asal Daerah Sukabumi, Bogor Dan Tangerang. *Jurnal Penelitian Valentir*,2(3), 921- 925.
- [4] Suparno. 2000. Langkah-langkah Penulisan Artikel Ilmiah dalam Saukah, Ali dan Waseso, M.G. 2000. *Menulis Artikel untuk Jurnal Ilmiah*. Malang: UM Press.
- [5] Jannah, Miftahul. 2014. Waktu Henti Chloramphenicol Pada Lobster (*Chorax Quadricarinatus*) Air Tawar. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga.
- [6] Aisha, Sarah, Bambang Kuswandi dan Dwi Koko Pratoko. 2018. Pengembangan Sensor Kloramfenikol Berbasis Bouvine Serum Albumin Menggunakan Spektrofotometri UV. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol 6. No.1.
- [7] Riyanto, 2014. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Edisi 1. Cetakan 1. Yogyakarta: Deepublish.
- [8] Skoog, D.A., 1985, *Prinsiples of Instrumental Analysis*, CBS College Publishing, USA.
- [9] Miller, J.C. dan Miller. J.N. 1988. *Statistict for Analytical Chemistry*. Second Edition. New York: John Wiley & Son