

SNSU PK.M-01: 2024

Panduan Kalibrasi **MIKROPIPET**



SNSU PK.M-01: 2024

PANDUAN KALIBRASI MIKROPIPET

Penyusun: 1. Feizar Mahendra
2. Nurmalia Afiyani
3. Luthfiati Aprilia Sholihah
4. Heri Sutanto
5. Renanta Hayu Kresiani

Kontributor: 1. Ahmad Atsari Sujud
2. Yusuf Umardani
3. Toto Sugiharto
4. M. Kurniawan
5. Fahmy Munawar Cholil
6. Bambang Laksono Putro
7. Arif Rahman Hakim
8. Ahmad Badrus Soleh
9. Bumi Hera Rihlatu
10. Ian Rizki Ramadhan
11. Fadhli Ihsan
12. Fanfan Budi Mulya

Desain sampul: Ian Rizki Ramadhan

Direktorat Standar Nasional Satuan Ukuran Mekanika, Radiasi dan Biologi
Badan Standardisasi Nasional

Hak cipta © Badan Standardisasi Nasional, 2024

Lembar Pengesahan

Panduan kalibrasi mikropipet (SNSU PK.M-01: 2024) diterbitkan oleh Badan Standardisasi Nasional sebagai upaya untuk mengharmoniskan pelaksanaan kalibrasi mikropipet di laboratorium kalibrasi maupun institusi lain yang berkepentingan dengan pengukuran yang perlu dijamin keabsahannya. Panduan ini mencakup definisi umum, langkah-langkah kalibrasi, serta evaluasi ketidakpastian pengukuran. Panduan ini disusun berdasarkan acuan metode internasional, nasional, maupun sumber ilmiah lainnya melalui proses pembahasan internal di Direktorat Standar Nasional Satuan Ukuran Mekanika, Radiasi, dan Biologi serta dengan mempertimbangkan masukan dari para ahli di bidang metrologi massa dan besaran turunannya.

Dokumen ini diterbitkan secara bebas dan tidak untuk diperjualbelikan secara komersial. Bagian dari dokumen ini dapat dikutip untuk keperluan edukasi atau kegiatan ilmiah dengan menyebutkan sumbernya, namun tidak untuk keperluan komersial.

Disahkan tanggal 18 Desember 2024

Deputi Bidang Standar Nasional Satuan Ukuran

Yustinus Kristianto Widiwardono

DAFTAR ISI

1.	Pendahuluan	1
2.	Ruang lingkup	1
3.	Acuan normatif.....	1
4.	Istilah dan definisi	2
5.	Persyaratan umum	2
6.	Prinsip kalibrasi dan ketertelusuran.....	2
7.	Jenis mikropipet.....	3
8.	Peralatan pengukuran	4
9.	Timbangan.....	4
9.1.	<i>Peralatan ukur</i>	5
9.2.	<i>Penampung cairan</i>	5
9.3.	<i>Wadah timbang</i>	5
9.4.	<i>Perangkap penguapan (evaporation trap)</i>	6
9.5.	<i>Sarung tangan</i>	7
9.6.	<i>Cairan kalibrasi</i>	8
10.	Fasilitas dan kondisi lingkungan	8
10.1.	<i>Persyaratan umum</i>	8
10.2.	<i>Kondisi lingkungan</i>	8
10.3.	<i>Penguapan</i>	8
10.4.	<i>Waktu 1 siklus</i>	9
11.	Tahapan kalibrasi mikropipet	9
11.1.	<i>Pra-kalibrasi</i>	9
11.2.	<i>Proses kalibrasi</i>	10
11.3.	<i>Pasca-kalibrasi</i>	14
12.	Analisis data kalibrasi.....	14
12.1.	<i>Volume pada suhu acuan</i>	14
12.2.	<i>Massa evaporasi</i>	15
12.3.	<i>Penimbangan massa air destilasi</i>	16
12.4.	<i>Densitas air destilasi</i>	16
12.5.	<i>Densitas udara</i>	17
12.6.	<i>Rata – rata volume yang dialirkan</i>	17
12.7.	<i>Kesalahan sistematik pengukuran</i>	18
12.8.	<i>Kesalahan acak pengukuran</i>	18

12.9. <i>Evaluasi Ketidakpastian Pengukuran</i>	19
13. Pelaporan hasil kalibrasi.....	27
14. Contoh kalibrasi mikropipet.....	28
14.1. <i>Unit under test (UUT)</i>	28
14.2. <i>Standar dan peralatan lainnya</i>	28
14.3. <i>Data pengukuran</i>	28
14.4. <i>Analisis hasil kalibrasi</i>	30
14.5. <i>Evaluasi ketidakpastian hasil kalibrasi</i>	32
14.6. <i>Pelaporan hasil kalibrasi</i>	39
LAMPIRAN A.....	40
LAMPIRAN B	42
LAMPIRAN C	433
BIBLIOGRAFI	45

1. Pendahuluan

1.1. Panduan ini disusun untuk mengharmoniskan pelaksanaan kalibrasi mikropipet yang dilakukan oleh laboratorium kalibrasi yang menerapkan SNI ISO/IEC 17025: 2017 [1].

1.2. Metode yang diuraikan pada panduan ini mengacu pada dokumen ISO 8655-6: 2022 [2] dengan evaluasi ketidakpastian hasil kalibrasi mengacu pada dokumen JCGM 100: 2008 [3] dan berpedoman pada dokumen ISO/TR 20461: 2023 [4].

1.3. Panduan ini menggantikan panduan SNSU PK.M-01:2020

2. Ruang lingkup

2.1. Dokumen ini menjelaskan panduan kalibrasi mikropipet *single-channel* dan *multi-channel* dengan volume tetap (*fixed-volume*) dan volume variabel (*variable volume*) menggunakan metode gravimetrik dengan volume nominal 0,5 µl sampai 20 000 µl sesuai dengan ISO 8655-2:2022

2.2. Panduan kalibrasi ini juga menetapkan prosedur evaluasi ketidakpastian pengukuran yang terkait dengan kalibrasi mikropipet.

3. Acuan normatif

Dokumen – dokumen berikut dirujuk sedemikian rupa sehingga sebagian atau seluruh isinya merupakan persyaratan dari panduan ini. Untuk dokumen acuan yang mencantumkan tahun, dokumen yang berlaku hanya edisi yang dikutip. Sedangkan untuk dokumen acuan yang tidak dicantumkan tahunnya, dokumen yang berlaku adalah edisi terbaru termasuk amandemen dari dokumen tersebut.

ISO 3696:1987, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 8655-1:2022, *Piston-operated volumetric apparatus — Part 1: Terminology, general requirements and user recommendation*

ISO 8655-2:2022, *Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Pipettes*

ISO 8655-6:2022, *Piston-operated volumetric apparatus — Part 6: Gravimetric reference measurement procedure for the determination of volume*

ISO/TR 20461:2023, *Technical report — Determination of uncertainty for volume measurements of a piston operated volumetric apparatus using a gravimetric method*

DKD-R 8-1:2011. *Calibration of Piston-operated Pipettes with Air Cushion.*

4. Istilah dan definisi

Untuk keperluan interpretasi dalam panduan ini, berlaku istilah dan definisi yang diberikan dalam dokumen acuan dan acuan normatif.

Dalam panduan ini, bentuk verbal berikut digunakan:

- “harus” menunjukkan persyaratan;
- “sebaiknya” menunjukkan rekomendasi;
- “dapat” menunjukkan kemungkinan atau kemampuan.
- “volume nominal” menunjukkan volume yang dialirkan dari mikropipet. Pada mikropipet *multi-channel*, volume nominal menunjukkan volume yang dialirkan dari masing-masing *channel*.
- “*air cushion*” menunjukkan ruang yang terdapat diantara piston dengan ujung mikropipet.

5. Persyaratan umum

Dalam melakukan kalibrasi dengan merujuk pada prosedur pengukuran yang dijelaskan dalam panduan ini, seluruh ketentuan dan persyaratan harus diikuti atau melebihi (misalnya melakukan 30 daripada 10 pengulangan per volume). Jika satu atau lebih persyaratan tersebut tidak diikuti, maka kesesuaian terhadap dokumen ini tidak dapat di klaim.

6. Prinsip kalibrasi dan ketertelusuran

Metode gravimetrik adalah metode kalibrasi primer dengan tingkat ketelitian yang tinggi untuk menentukan volume cairan. Pada metode ini volume ditentukan berdasarkan massa cairan kalibrasi (air destilasi) yang dialirkan dari mikropipet, dengan syarat cairan kalibrasi yang digunakan diketahui suhu dan densitasnya serta mempertimbangkan pengaruh dari gaya apung udara (*air buoyancy*).

Ketertelusuran kalibrasi mikropipet diperoleh dari penimbangan massa air destilasi menggunakan timbangan yang terkalibrasi dan penentuan nilai densitasnya menggunakan peralatan yang terkalibrasi (penjelasan lebih rinci pada sub-judul 8).

7. Jenis mikropipet

Berdasarkan ISO 8655-2 [5] terdapat dua jenis mikropipet

- a. *Fix volume* (volume tetap), yang dirancang oleh pabrikan untuk mengeluarkan volume cairan satu kapasitas nominal, misalnya 100 μl
- b. *Variable volume* (volume variabel/ pada dokumen lain menyebutkan *adjustable volume*), dirancang oleh pabrikan untuk mengeluarkan volume yang dapat dipilih oleh pengguna dalam satu kapasitas nominal misalnya (10 ~100) μl .

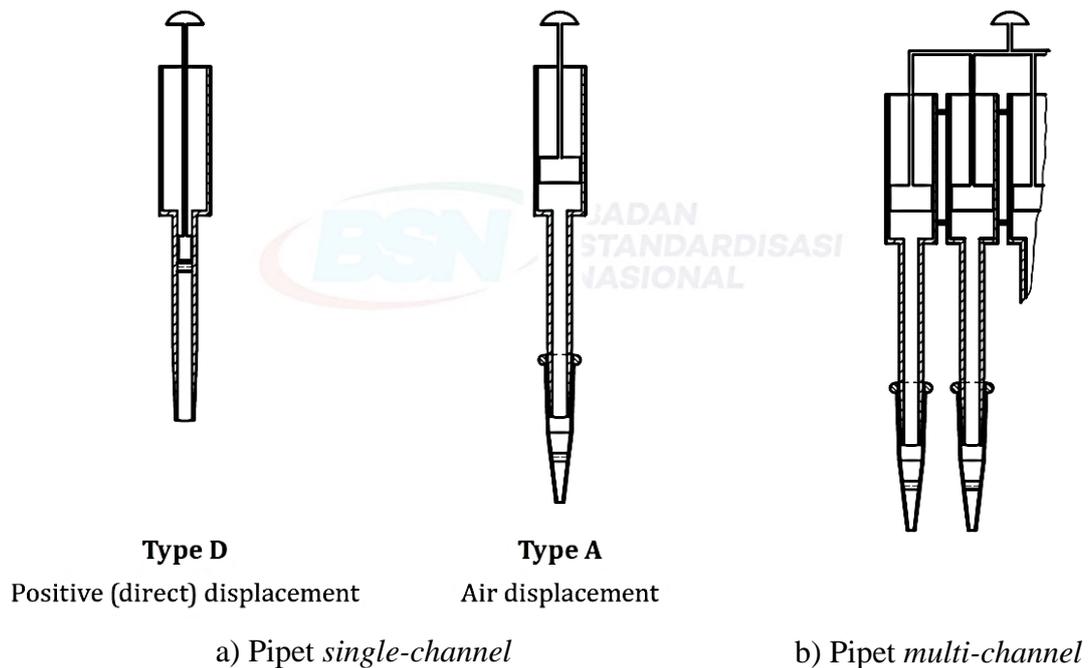
Mikropipet dibedakan atas dua tipe yaitu:

- a. Type A (*Air Displacement Pipettes*)

Terdapat kantung udara diantara kepala piston dan permukaan cairan di dalam silinder .

- b. Type D (*Positive/Direct Displacement*)

Kepala piston langsung mengenai cairan.



Gambar1. Jenis mikropipet

8. Peralatan pengukuran

Beberapa persyaratan peralatan dan cairan kalibrasi harus dipenuhi agar tidak berpengaruh buruk terhadap hasil pengukuran dan sesuai dengan tujuan kalibrasi.

9. Timbangan

Timbangan yang digunakan untuk kalibrasi harus dipilih berdasarkan persyaratan minimum pada Tabel 1, bergantung pada volume nominal alat yang dikalibrasi. Timbangan dapat digunakan selama ketidakpastian terentangnya masih dibawah seperempat *maximum permissible systematic error* nya. Timbangan dengan ketidakpastian lebih besar dari yang dipersyaratkan, dapat digunakan untuk volume nominal yang lebih besar.

Tabel 1. Persyaratan minimum timbangan

Volume nominal V	Resolusi timbangan Mg	Daya ulang timbangan ^a mg	Ketidakpastian $U (k = 2)$ ^{a,b} mg
$0,5 \mu\text{l} \leq V < 20 \mu\text{l}$	0,001	0,006 ^{c,e}	0,012 ^{c,e}
	0,01	0,03 ^d	0,06 ^d
$20 \mu\text{l} \leq V < 200 \mu\text{l}$	0,01	0,025	0,05
$200 \mu\text{l} \leq V < 10 \text{ ml}$	0,1	0,2	0,4
$10 \text{ ml} \leq V < 20 \text{ ml}$	1	2	4

- Daya ulang dan ketidakpastian bentangan yang digunakan pada tabel berlaku untuk kalibrasi mikropipet *single-channel*. Apabila timbangan *single-channel* digunakan untuk kalibrasi mikropipet *multi-channel*, maka daya ulang dan ketidakpastian bentangan yang digunakan dua kali lipat dari nilai yang tercantum di tabel.
- Ketidakpastian hasil penimbangan dapat diambil dari sertifikat kalibrasi timbangan (nilai ketidakpastian bentangan). Jika tidak ada, ketidakpastian dapat dihitung dengan menggunakan ketidakpastian dari kalibrasi dan kesalahan yang tidak terkoreksi (*non-corrected errors*) seperti kemungkinan adanya drift dan efek lingkungan dari sensitivitas timbangan.
- Timbangan *single-channel*.
- Timbangan *multi-channel*, hanya berlaku untuk mikropipet *multi-channel*. Timbangan *multi-channel*, dengan resolusi 0,01 mg dapat digunakan untuk kalibrasi mikropipet *multi-channel* dengan volume

nominal dibawah 20 µl jika ketidakpastian bentangan timbangannya kurang dari seperempat *maximum permissible systematic error* yang diijinkan.

- e. Untuk mikropipet *single-channel* dengan volume nominal dibawah 2 µl, timbangan dengan daya ulang dan ketidakpastian bentangan ketidakpastian yang lebih baik dari nilai dalam tabel harus digunakan, sehingga ketidakpastian bentangan timbangan yang digunakan kurang dari seperempat *maximum permissible systematic error* yang diijinkan. [2]

9.1. Peralatan ukur

Beberapa perlatan pengukuran dibutuhkan untuk proses kalibrasi mikropipet, seperti termometer cairan dan sensor untuk memantau kondisi lingkungan. Persyaratan minimum untuk setiap alat ukur terkait, dijelaskan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persyaratan minimum peralatan ukur

Peralatan pengukuran	Resolusi	Ketidakpastian $U (k=2)$
Termometer cairan	0,1 °C	0,2 °C
Termometer lingkungan	0,1 °C	0,3 °C
Higrometer	1 %RH	5 %RH
Barometer	0,1 kPa	1 kPa
Stopwatch	1 s	Tidak ditentukan

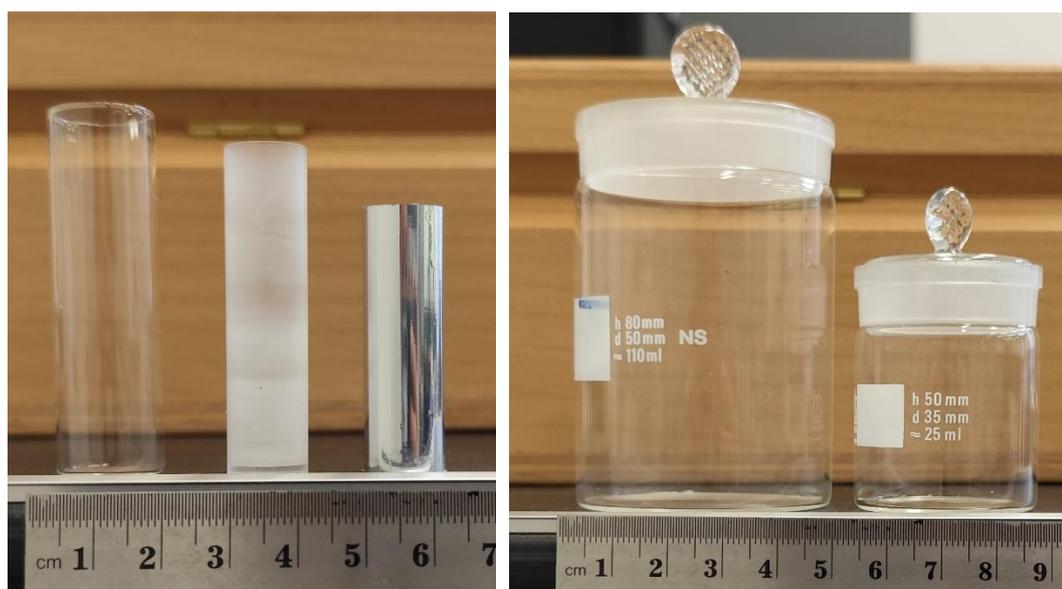
9.2. Penampung cairan

Penampung cairan merupakan wadah yang digunakan untuk mengondisikan cairan kalibrasi yang akan digunakan, setelah cairan kalibrasi diambil dari tempat penyimpanannya. Untuk meminimalisir perbedaan suhu antara cairan kalibrasi dan ruang kalibrasi, direkomendasikan untuk menggunakan penampung cairan berbahan gelas. Laboratorium dapat menggunakan wadah seperti *beaker glass*, dengan kapasitas yang cukup untuk menyelesaikan satu seri kalibrasi.

9.3. Wadah timbang

Wadah timbang adalah bejana yang diletakkan di dalam timbangan dan digunakan untuk menampung cairan kalibrasi yang dialirkan dari mikropipet, agat dapat ditimbang. Wadah timbang dapat terbuat dari bahan gelas, akrilik atau logam

ringan tahan karat. Wadah timbang dapat berbentuk tabung/silinder. Pemilihan wadah timbang harus memperhatikan 2 hal agar tidak memberi pengaruh buruk pada hasil kalibrasi, yaitu diameter bagian dalam wadah, dan kapasitas wadah. Semakin besar diameter wadah, maka luas permukaan air yang bersentuhan langsung dengan udara semakin besar, akibatnya jumlah air yang hilang karena penguapan semakin besar. Hal ini memperbesar kesalahan pengukuran terutama pada volume nominal dibawah 50 μl . Sedangkan kapasitas wadah harus cukup untuk menampung satu seri pengukuran agar wadah tidak penuh sebelum kalibrasi selesai. Wadah timbang berbentuk tabung membutuhkan diameter besar untuk dapat menampung air destilasi dari satu seri kalibrasi volume nominal diatas 1000 μl . Agar penguapan tidak memberikan efek buruk, direkomendasikan untuk menggunakan wadah timbang dengan penutup.



Gambar 2. Wadah timbang

9.4. Perangkat penguapan (*evaporation trap*)

Salah satu cara untuk mengurangi efek penguapan adalah dengan penggunaan perangkat penguapan (*evaporation trap*). *Evaporation trap* harus digunakan untuk kalibrasi mikropipet dengan volume nominal dibawah 50 μl , dan sangat direkomendasikan untuk digunakan hingga volume nominal 1000 μl . *Evaporation trap* dibuat sedemikian rupa agar dapat menampung air destilasi untuk menjaga

kelembapan relatif disekitar wadah timbang tetap tinggi, dengan tujuan untuk mengurangi penguapan air destilasi yang dialirkan dari mikropipet ke wadah timbang. *Evaporation trap* dapat terbuat dari bahan logam tahan karat atau akrilik. *Evaporation trap* dipasang pada timbangan tanpa menyentuh *pan* timbangan dan wadah timbang agar tidak mengganggu pembacaan timbangan saat kalibrasi dilakukan. Penggunaan *evaporation trap* dapat mengurangi kesalahan pengukuran akibat penguapan pada volume nominal dibawah 50 μl .



Gambar 3. Perangkat penguapan (*Evaporation trap*)

Sumber : A. Hantz, "Evaporation minimization at piston pipettes calibration by gravimetric method thanks to using evaporation trap .," *Imeko 2013*, 2013

9.5. Sarung tangan

Sarung tangan dapat digunakan untuk meminimalkan pengaruh suhu tangan pada mikropipet saat kalibrasi. Sarung tangan yang direkomendasikan yaitu sarung tangan *nitrile powder free*, seperti Gambar 3.



Gambar 4. Sarung tangan

9.6. Cairan kalibrasi

Cairan kalibrasi yang digunakan adalah air destilasi atau air deionisasi yang telah diketahui nilai densitasnya dengan spesifikasi *grade 3* atau lebih baik menurut ISO 3696:1987, dimana nilai densitasnya ditentukan berdasarkan suhu dari cairan tersebut. Selama proses kalibrasi, perbedaan suhu antara suhu air destilasi dengan suhu udara di ruang kalibrasi harus berkisar ± 0.5 °C.

10. Fasilitas dan kondisi lingkungan

10.1. Persyaratan umum

Seluruh peralatan yang digunakan untuk kalibrasi mikropipet harus dioperasikan sebagaimana instruksi pabrik.

10.2. Kondisi lingkungan

Kalibrasi harus dilakukan pada ruangan yang bebas angin dengan lingkungan yang stabil. Kelembapan relatif ruang kalibrasi harus antara 45% - 80% dengan suhu (20 ~ 25) °C dengan variasi maksimum ± 0.5 °C selama pengondisian (minimal selama 2 jam) dan proses kalibrasi. Sebelum kalibrasi, seluruh peralatan dan cairan kalibrasi harus dikondisikan hingga mencapai kesetimbangan dengan kondisi yang dipersyaratkan.

10.3. Penguapan

Kesalahan akibat penguapan cairan kalibrasi selama penimbangan harus menjadi pertimbangan, khususnya pada volume nominal dibawah 50 μl . Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, bentuk wadah timbang berpengaruh langsung terhadap jumlah air yang hilang akibat penguapan. Selain itu, semakin lama durasi yang dibutuhkan untuk menyelesaikan satu seri pengukuran, semakin besar jumlah penguapan yang terjadi. Oleh karena itu, selain dari bentuk wadah penimbangan, waktu siklus kalibrasi juga sangat penting (lihat 10.4). Waktu siklus kalibrasi perlu ditentukan oleh laboratorium agar dapat menghitung estimasi penguapan yang terjadi selama proses kalibrasi, dan melakukan koreksi secara matematis dalam analisis hasil kalibrasinya.

10.4. Waktu 1 siklus

Waktu satu siklus adalah waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan siklus satu kali pengaliran air hingga pembacaan timbangan stabil. Penting agar waktu 1 siklus, sebagaimana dijelaskan di atas, teratur dari siklus ke siklus, tujuannya adalah untuk mengetahui massa air yang hilang akibat penguapan dalam 1 siklus pengambilan data kalibrasi.

Percobaan waktu 1 siklus dilakukan sebelum memulai prosedur pengambilan data kalibrasi (lihat 11.2). Waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan 1 siklus ini kemudian diterapkan sebelum memulai siklus pertama pengambilan data kalibrasi, setelah siklus ke 5 (atau setelah pengambilan data terakhir sebelum mengganti tip mikropipet), dan dapat diulangi setelah menyelesaikan seluruh proses pengambilan data.

11. Tahapan kalibrasi mikropipet

11.1. Pra-kalibrasi

Tahap pra-kalibrasi merupakan tahap awal dari kalibrasi mikropipet. Tujuan dari tahapan ini yaitu untuk memastikan mikropipet, timbangan dan peralatan kalibrasi lainnya siap digunakan dan telah mencapai kestabilan termal. Kegiatan yang dilakukan pada tahapan ini diantaranya:

1. Pengondisian

Sebelum masuk ke tahap pengambilan data kalibrasi, pengondisian harus dilakukan agar mikropipet, timbangan, air destilasi, sensor kondisi lingkungan dan peralatan lainnya siap digunakan dan telah mencapai kesetimbangan termal. Peralatan-peralatan tersebut harus didiamkan di ruang kalibrasi dengan kondisi lingkungan yang memenuhi persyaratan minimal selama 2 jam (waktu kesetimbangan minimum). Selama pengondisian, termometer cairan sebaiknya sudah dicelupkan ke wadah penampung cairan berisi air destilasi yang akan digunakan untuk kalibrasi.

2. Persiapan timbangan

Persiapan timbangan dilakukan terhadap timbangan yang akan digunakan, sehingga timbangan dapat menunjukkan nilai yang tepat dan konsisten. Timbangan didiamkan dalam kondisi hidup minimal selama 1 jam ketika timbangan dalam keadaan *standby* (terkoneksi dengan aliran listrik) atau minimal selama 2 jam ketika timbangan tidak terkoneksi dengan aliran listrik atau sesuai dengan manual timbangan. Selama periode tersebut, *evaporation trap* harus sudah terpasang dan terisi air (jika menggunakan *evaporation trap*), dan wadah timbang yang sudah bersih, terisi cairan dalam jumlah cukup untuk melapisi bagian bawah wadah untuk menjaga kelembapan relatif tetap tinggi, sudah diletakkan di *pan* timbangan.

3. Penentuan titik ukur

Pada mikropipet *fixed-volume*, volume yang dikalibrasi adalah volume nominalnya. Sedangkan pada mikropipet dengan *variable-volume* (*single-channel* dan *multi-channel*), setidaknya dikalibrasi pada 3 titik yaitu;

- a. volume maksimal
- b. 50 % volume maksimal, atau yang paling dekat (apabila jaraknya sama, gunakan titik yang lebih besar)
- c. volume terendah yang bisa digunakan, atau 10% volume maksimal (pilih volume yang lebih besar)

4. Pengecekan dan *adjustment*

Sebelum kalibrasi dilakukan, perlu dilakukan pengecekan terhadap kondisi fisik serta fungsi dari mikropipet. Mikropipet harus berfungsi dengan baik untuk mengalirkan air sesuai dengan volume nominal yang diinginkan. Jika diperlukan, *adjustment* dapat dilakukan mengikuti rekomendasi pabrikan.

11.2. Proses kalibrasi

Proses kalibrasi mikropipet dapat dilakukan setelah tahap pengondisian terpenuhi. Proses kalibrasi dilakukan sesuai dengan langkah – langkah berikut:

Mikropipet *single-channel* (sesuai dengan ISO 8655-2)

1. Siapkan lembar kerja (*worksheet*) kalibrasi mikropipet

2. Catat identitas mikropipet, timbangan dan peralatan kalibrasi lainnya yang digunakan
3. Catat kondisi awal lingkungan ruang kalibrasi (suhu, kelembapan relatif dan tekanan udara)
4. Tentukan dan pasang tip yang akan digunakan
5. Tentukan waktu 1 siklus
 - Mulai *timer*
 - Tekan *plunger* mikropipet sampai posisi stop pertama
 - Celupkan tip mikropipet ke air destilasi secara vertikal dengan kedalaman yang direkomendasikan (lihat Tabel 3)

Tabel 3. Kedalaman pencelupan dan waktu tunggu selama pengambilan air destilasi

Volume (μl)	Kedalaman pencelupan (mm)	Waktu tunggu (s)
≤ 1	1 sampai 2	1
> 1 sampai 100	2 sampai 3	1
> 100 sampai 1 000	2 sampai 4	1
> 1 000 sampai 20 000	4 sampai 6	3

- Lepaskan *plunger* secara perlahan, dan tunggu sesuai waktu tunggu yang direkomendasikan
- Angkat tip secara vertikal dari air destilasi
- Buka tutup *evaporation trap*
- Sentuhkan tip pada wadah timbang dengan kemiringan sekitar 30° sampai 45°
- Tekan *plunger* sampai posisi stop yang kedua (*blow-out*)
- Tarik ujung tip sejauh 8 -10 mm sepanjang dinding dalam wadah timbang untuk menghilangkan sisa tetesan disekitar ujung tip, dan lepaskan *plunger* secara perlahan
- Tutup *evaporation trap*
- Tunggu sampai penunjukan stabil, kemudian matikan *timer*
- Catat penunjukan timer sebagai waktu 1 siklus

6. Lakukan pembasahan dengan menyedot cairan kalibrasi dan mengeluarkannya lagi sebanyak 5 kali untuk mencapai kesetimbangan kelembapan pada ruang piston pipet
7. Catat penunjukan timbangan m_0 dari wadah timbang atau lakukan *tare* timbangan ke 0 ($m_{00} = 0$)
8. Tunggu selama waktu 1 siklus, kemudian catat penunjukan timbangan sebagai m_0
9. Tekan plunger sampai posisi stop pertama
10. Tahan pipet dalam posisi vertikal, celupkan ujung tip ke cairan kalibrasi dengan kedalaman yang direkomendasikan pada Tabel 3
11. Lepaskan plunger secara perlahan, dan tunggu selama sesuai waktu tunggu (lihat Tabel 3)
12. Tarik tip dari cairan kalibrasi secara vertikal dan perlahan
13. Buka tutup evaporation trap
14. Sentuhkan ujung tip ke bagian dalam wadah timbang dengan sudut sekitar 30° sampai 45°
15. Tekan plunger dan alirkan cairan ke wadah timbang
16. Apabila ada, gunakan fungsi tiup pada pipet (stop kedua) untuk mengeluarkan tetesan akhir cairan kalibrasi
17. Tarik ujung tip sejauh 8 -10 mm sepanjang dinding dalam wadah timbang untuk memastikan tidak ada tetesan yang menempel disekitar ujung tip
18. Angkat ujung tip dari wadah timbang, dan lepaskan plunger secara perlahan
19. Tutup evaporation trap
20. Tunggu sampai penunjukan timbangan stabil dan catat penunjukan timbangan m_i ($i = 1$ sampai 10) dari wadah timbang yang sudah ditambahkan cairan kalibrasi (jika menggunakan *tare*, m_i adalah berat cairan kalibrasi yang sudah dialirkan) dan hitung selisih berat antara sebelum dan sesudah pengaliran cairan kalibrasi.
21. Catat suhu air destilasi
22. Ulangi siklus kalibrasi mulai dari nomor 9 sampai 21 hingga diperoleh nilai m_{10}

23. Tunggu selama waktu 1 siklus, kemudian catat penunjukan timbangan sebagai m_{11}

23. Catat kondisi akhir lingkungan kalibrasi

Selama pengulangan pengukuran, tip mikropipet harus diganti setidaknya satu kali untuk mendeteksi penggunaan tip yang rusak atau cacat produksi dan menilai variabilitas tip yang digunakan. Untuk pengulangan $n=10$, setidaknya gunakan 2 tip, dan tip harus diganti minimal sekali setiap 5 pengukuran. Setiap penggantian tip, harus dilakukan proses pembasahan dimulai dari nomor 6 lagi.

Mikropipet *multi-channel* (sesuai dengan ISO 8655-2)

Mikropipet *multi-channel* mirip dengan mikropipet *single-channel*. Setiap *channel* harus dianggap sebagai saluran tunggal dan dikalibrasi dan dilaporkan seperti *single-channel*. Semua *channel* dari pipet *multi-channel* harus dikalibrasi untuk masing-masing *channel*.

Umumnya ada 2 metode yang memungkinkan untuk mengkalibrasi mikropipet *multi-channel*.

- a. Penggunaan timbangan *multi-channel* untuk mengukur volume nominal yang dialirkan dari seluruh *channel* secara bersamaan, dengan menghisap dan mengalirkan masing-masing *channel* di waktu yang sama dan menganalisis hasil masing-masing *channel* satu persatu.
- b. Setiap *channel* dapat diukur satu persatu dengan timbangan *single-channel*. Caranya adalah dengan menghisap air destilasi ke semua *channel* bersamaan, pengaliran air juga dilakukan bersamaan, namun hanya air dari *channel* yang dikalibrasi yang ditampung untuk diukur. Contoh, jika akan mengkalibrasi *channel* 1, air dari *channel* 1 dialirkan ke wadah timbang, sementara air dari *channel* lainnya ditampung ke wadah lain dan tidak digunakan. Untuk dapat mengkalibrasi mikropipet *multi-channel* menggunakan timbangan *single-channel*, laboratorium harus memodifikasi timbangan dengan membuat wadah penampung disekitar wadah timbang untuk menampung air dari *channel* lain yang tidak digunakan. Modifikasi ini harus mempertimbangkan agar wadah penampung tersebut tidak menyentuh *pan* timbangan dan wadah

timbang, serta tidak memungkinkan adanya air yang jatuh ke *pan* timbangan saat kalibrasi dilakukan.

Mikropipet Positif *displacement*

Untuk jenis mikropipet ini, kalibrasi harus sesuai dengan prosedur kalibrasi mikropipet *single-channel*. Namun, pengondisian untuk mencapai kesetimbangan kelembapan sebelum kalibrasi hanya diperlukan apabila dipersyaratkan oleh pabrik. Penggantian tip seperti pada mikropipet *single-channel* hanya dilakukan saat mengkalibrasi mikropipet positif *displacement* tipe D2 (sesuai dengan ISO 8655-2:2022) dengan tip sekali pakai. Instruksi pabrik harus diikuti untuk pengisian tip bebas gelembung udara

11.3. Pasca-kalibrasi

Setelah kalibrasi mikropipet selesai dilakukan, maka langkah selanjutnya yaitu pembersihan peralatan kalibrasi dan simpan kembali ketempat semula serta pastikan seluruh peralatan dalam keadaan baik.

12. Analisis data kalibrasi

Analisis data kalibrasi dilakukan untuk mendapatkan nilai volume pada suhu acuan dari mikropipet yang dikalibrasi.

12.1. Volume pada suhu acuan

Volume pada suhu acuan dari mikropipet yang dikalibrasi dapat dihitung menggunakan Persamaan (1).

$$V_{ref} = (m_L - m_E + m_{evap}) \times \frac{1}{(\rho_w - \rho_A)} \times \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_B}\right) \times [1 - \gamma(t_w - t_{ref})] \quad (1)$$

dengan,

V_{ref} = Volume pada suhu acuan (ml);

m_L = Pembacaan timbangan pada wadah timbang setelah air destilasi dialirkan (g);

m_E = Pembacaan timbangan pada wadah timbang sebelum pengaliran air destilasi (g) ; nilai $m_E = 0$ jika timbangan di nol-kan (*tare*) dengan wadah timbang

- m_{evap} = Estimasi massa evaporasi dalam 1 siklus (g);
- ρ_W = Densitas air destilasi (g/ml) pada suhu t ($^{\circ}\text{C}$), dihitung menggunakan Persamaan "Tanaka";
- ρ_A = Densitas udara (g/ml), pada suhu, kelembapan dan tekanan atmosfer selama kalibrasi;
- ρ_B = Densitas anak timbangan acuan (g/ml);
- γ = Koefisien muai termal material pembuatan mikropipet ($^{\circ}\text{C}^{-1}$);
- t_w = Suhu dari mikropipet yang dikalibrasi yang diasumsikan sama dengan nilai suhu air destilasi ($^{\circ}\text{C}$);
- t_{ref} = Temperatur acuan dari mikropipet (20 $^{\circ}\text{C}$ atau 27 $^{\circ}\text{C}$);

12.2. Massa evaporasi

Penentuan massa evaporasi (penguapan) selama 1 siklus dalam proses kalibrasi dihitung dengan menghitung perbedaan antara massa awal (m_{00}) dan massa setelah menerapkan waktu 1 siklus tanpa mengalirkan cairan kedalam timbangan (m_0). Proses ini dapat diulangi lagi di akhir kalibrasi sebelum penggantian tip dilakukan, untuk memperoleh (m_n) dan (m_{n+1}).

Rata - rata kehilangan akibat penguapan dapat dihitung dengan

$$m_{evap} = \frac{(m_{00} - m_0) + (m_n - m_{n+1})}{2} \quad (2)$$

dengan,

- m_{evap} = Estimasi massa evaporasi dalam satu siklus (g);
- m_{00} = Pembacaan timbangan saat pertama kali (g);
- m_0 = Pembacaan timbangan setelah penerapan waktu 1 siklus (g);
- m_n = Pembacaan timbangan untuk pengambilan data ke-n (g);
- m_{n+1} = Pembacaan timbangan untuk pengambilan data ke-n setelah penerapan waktu 1 siklus (g).

12.3. Penimbangan massa air destilasi

Penimbangan massa air destilasi dilakukan menggunakan timbangan yang sesuai dengan persyaratan pada Tabel 1. Massa air destilasi diperoleh dari hasil penunjukan timbangan pada wadah timbang setelah pengaliran air destilasi (m_L) dikurangi dengan penunjukan timbangan pada wadah timbang sebelum pengaliran air (m_E) ditambah massa air yang hilang akibat penguapan (m_{evap}). Ada 2 skema penimbangan yang dapat digunakan untuk kalibrasi mikropipet, yaitu:

- Penimbangan tanpa *tare*. Pembacaan timbangan sebelum pengaliran air destilasi ke dalam wadah timbang, dicatat sebagai (m_E) dan tidak di nol-kan (*tare*).
- Penimbangan dengan *tare*. Fungsi *tare* pada timbangan adalah untuk memberikan penunjukan 0 (nol) pada timbangan, saat timbangan diberi beban. Pada skema ini, sebelum pengaliran air destilasi, timbangan di nol-kan (*tare*). Hal ini dilakukan untuk seluruh siklus kalibrasi. Sehingga (m_E) di setiap siklus selalu bernilai 0.

12.4. Densitas air destilasi

Densitas air destilasi dapat ditentukan berdasarkan Persamaan Tanaka [6] selama persyaratan air destilasi pada subbab 9 terpenuhi. Nilai densitas dihitung menggunakan Persamaan (3).

$$\rho_w = a_5 \left[1 - \frac{(t+a_1)^2(t+a_2)}{a_3(t+a_4)} \right] \quad (3)$$

dengan,

- t = Suhu air destilasi (°C);
- a_1 = -3,983 035 (°C);
- a_2 = 301,797 (°C);
- a_3 = 522 528,9 (°C²);
- a_4 = 69,348 81 (°C);
- a_5 = 0,999 974 950 (g/ml);

Nilai densitas air destilasi yang diperoleh dari Persamaan (3) merupakan nilai densitas air destilasi pada kondisi tanpa udara (*air-free*). Koreksi densitas air destilasi akibat kandungan udara pada suhu 0 °C sampai 25 °C dapat dilakukan menggunakan Persamaan (4).

$$\Delta\rho = s_0 + s_1 t \quad (4)$$

dengan,

t = Suhu air destilasi (°C);

s_0 = $-4,612 (10^{-6} \text{ g ml}^{-1})$;

s_1 = $0,106 (10^{-6} \text{ g ml}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1})$;

12.5. Densitas udara

Densitas udara dapat ditentukan menggunakan Persamaan CIPM-2007 yang disederhanakan. Persamaan (5) dapat digunakan hanya pada kondisi tekanan udara 600 hPa sampai 1100 hPa, suhu udara 15 °C sampai 27 °C dan kelembapan relatif antara 20 %RH sampai 80 %RH.

$$\rho_A = \frac{0,348\ 48 (p) - 0,009 (h_r) \exp(0,061 (t))}{t + 273,15} \quad (5)$$

dengan,

t = Suhu lingkungan ruang kalibrasi (°C);

p = tekanan udara (hPa);

h_r = kelembapan relatif (%RH);

Dalam penentuan nilai densitas udara, udara yang dimaksud yaitu udara yang berada di dalam *chamber* timbangan. Oleh karena itu, sensor suhu, kelembapan relatif dan tekanan udara sebaiknya ditempatkan sedekat mungkin dengan timbangan yang digunakan untuk mengkalibrasi mikropipet.

12.6. Rata – rata volume yang dialirkan

Perhitungan rata – rata volume (\bar{V}) yang dialirkan adalah:

$$\bar{V} = \frac{\sum_{i=1}^n V_{i,\text{ref}}}{n}$$

(6)

dengan

\bar{V} = Volume rata - rata yang dialirkan;

$V_{i,ref}$ = Volume dalam suhu acuan pada pengambilan data ke-i;

n = Jumlah total pengambilan data

12.7. Kesalahan sistematis pengukuran

Kesalahan sistematis dari pengukuran mikropipet dapat dihitung dengan persamaan:

$$e_s = \bar{V} - V_s \quad (7)$$

dimana

e_s = kesalahan sistematis pengukuran, dalam satuan volume

V_s = volume yang dikalibrasi

Jika kesalahan sistematis dinyatakan dalam persen Persamaan (7) dapat diubah menjadi Persamaan (8)

$$\eta_s = 100 \% \times (\bar{V} - V_s)/V_s \quad (8)$$

dimana η_s adalah kesalahan sistematis pengukuran dalam persen.

Pada mikropipet dengan *fixed-volume*, volume yang dikalibrasi adalah volume nominal.

12.8. Kesalahan acak pengukuran

Kesalahan acak dari pengukuran mikropipet sama dengan pengulangan atau standar deviasi, sehingga nilai kesalahan acak dapat dihitung menggunakan Persamaan (9).

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n-1}} \quad (9)$$

dimana s_r adalah standar deviasi, dalam satuan volume.

Kesalahan acak juga dapat dilaporkan dalam persen dengan koefisien variasi, C_V , menggunakan Persamaan (10)

$$C_V = 100\% \times \frac{s_r}{\bar{v}} \quad (10)$$

dimana C_V adalah koefisien variasi dalam persen.

12.9. Evaluasi Ketidakpastian Pengukuran

Nilai volume pada suhu acuan hasil kalibrasi akan lengkap hanya jika disertai dengan nilai ketidakpastiannya. Ketidakpastian baku hasil kalibrasi mikropipet pada volume nominal V_{ref} dihitung dengan Persamaan (11)

$$u^2(V_{ref}) = \sum_i c_i^2 \times u^2(x_i) \quad (11)$$

dengan,

$u^2(x_i)$ = ketidakpastian baku dari masing-masing sumber ketidakpastian

c_i^2 = koefisien sensitifitas dari masing-masing sumber ketidakpastian

Sumber-sumber ketidakpastian pengukuran

Sumber ketidakpastian pengukuran dievaluasi berdasarkan Persamaan (11) dan dapat disesuaikan dengan kondisi laboratorium. Masing-masing sumber ketidakpastian dapat dianalisis sebagai berikut:

1. Ketidakpastian penimbangan massa air destilasi (u_m)

Ketidakpastian baku dari penimbangan massa air destilasi dianalisis berdasarkan penunjukan timbangan pada wadah timbang yang berisi air destilasi pada volume nominal tertentu, penunjukan timbangan pada wadah timbang sebelum pengaliran air destilasi dan kehilangan air akibat penguapan. Nilai ketidakpastian dapat dihitung menggunakan Persamaan (12).

$$u_m = [u^2(m_L) + u^2(m_E) + u^2(\delta m) + u^2(m_{evap})]^{1/2} \quad (12)$$

dengan,

$u(m_L)$ = Ketidakpastian hasil penimbangan air destilasi

$u(m_E)$ = Ketidakpastian pembacaan timbangan pada wadah timbang sebelum pengaliran air destilasi

$u(\delta m)$ = Ketidakpastian akibat ketidakstabilan penimbangan

$u(m_{evap})$ = Ketidakpastian akibat penguapan dalam satu siklus (ketidakpastian ini ditentukan secara eksperimental dari laboratorium kalibrasi)

Ketidakpastian hasil penimbangan dapat diambil dari sertifikat kalibrasi timbangan (nilai ketidakpastian bentangan). Jika tidak ada, ketidakpastian dapat dihitung dengan menggunakan ketidakpastian dari kalibrasi dan kesalahan yang tidak terkoreksi (*non-corrected errors*) seperti kemungkinan adanya *drift* dan efek lingkungan dari sensitivitas timbangan.

$$u(m_L) = u(m_E) = [u(bal)^2 + u(res)^2]^{1/2} \quad (13)$$

dengan,

$u(bal)$ = Ketidakpastian dari hasil kalibrasi timbangan

$u(res)$ = Ketidakpastian dari resolusi timbangan

Perhitungan ketidakpastian penimbangan massa air destilasi ini ditentukan dengan mempertimbangkan bahwa wadah timbang tidak dikeluarkan selama kalibrasi. Ketidakpastian tambahan diperlukan jika wadah timbang dikeluarkan dari timbangan.

2. Ketidakpastian pengukuran suhu mikropipet dan air destilasi (u_t)

Ketidakpastian baku dianalisis berdasarkan ketidakpastian hasil pengukuran suhu air destilasi dan ketidakpastian akibat adanya perbedaan antara suhu air destilasi dan suhu lingkungan ruang kalibrasi. Nilai ketidakpastian dapat dihitung menggunakan Persamaan (14).

$$u_t = [u^2(t_W) + u^2(\delta t_S)]^{1/2} \quad (14)$$

dan

$$u(t_W) = \left[\left(\frac{U(ther)}{k} \right)^2 + u^2(t_{res}) + u^2(\delta t) \right]^{1/2} \quad (15)$$

dengan,

$u(t_W)$ = Ketidakpastian pengukuran air destilasi

$U(ther)$ = Ketidakpastian bentangan hasil kalibrasi sensor suhu air destilasi

k = Faktor cakupan

$u(t_{res})$ = Ketidakpastian resolusi sensor suhu air destilasi

$u(\delta t)$ = Ketidakpastian akibat *drift* termometer

$u(\delta t_s)$ = Ketidakpastian akibat perbedaan suhu air destilasi dan suhu peralatan volume selama kalibrasi

3. Ketidakpastian dari penentuan nilai densitas air destilasi (u_{ρ_w})

Ketidakpastian baku dari penentuan nilai densitas air destilasi $u(\rho_w)$ dapat dihitung menggunakan Persamaan (16)

$$u(\rho_w) = [u^2(\rho_{w,form}) + u^2(\delta\rho_w) + u^2(\rho_{w,t})]^{1/2} \quad (16)$$

dengan,

$$u(\rho_{w,form}) = 4,5 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$$

$u(\delta\rho_w)$ = Ketidakpastian dari kemurnian air destilasi

$u(\rho_{w,t})$ = Ketidakpastian dari variasi nilai densitas air destilasi akibat variasi suhu air destilasi selama kalibrasi

dimana,

$$u(\rho_{w,t}) = u(t_w) \times \beta \times \rho_w(t_w) \quad (17)$$

koefisien muai termal air destilasi dapat diestimasi menggunakan Persamaan (18)

$$\beta = (-0,1176 \times t^2 + 15,846 \times t - 62,677) \times 10^{-6} \text{ (}^\circ\text{C}^{-1}) \quad (18)$$

4. Ketidakpastian dari penentuan nilai densitas udara (u_{ρ_A})

Ketidakpastian baku dari penentuan nilai densitas udara dianalisis berdasarkan Persamaan CIPM-2007. Untuk Persamaan CIPM-2007 yang disederhanakan, ketidakpastian baku relatif dari Persamaan tersebut sebesar $u_{form} = 2,4 \times 10^{-4}$. Selain ketidakpastian baku relatif dari Persamaan (5), ketidakpastian baku densitas udara ditentukan berdasarkan estimasi ketidakpastian suhu, kelembapan relatif dan tekanan udara.

$$u(\rho_A) = \rho_A \times \left[\left(\frac{u_{p_A}(\rho_A)}{\rho_A} \times u(p_A) \right)^2 + \left(\frac{u_{t_A}(\rho_A)}{\rho_A} \times u(t_A) \right)^2 + \left(\frac{u_{hr}(\rho_A)}{\rho_A} \times u(hr) \right)^2 + \left(\frac{u_{form}(\rho_A)}{\rho_A} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (19)$$

dengan,

$$u_{p_A}(\rho_A)/\rho_A = 1 \times 10^{-5} \text{ Pa}^{-1} \text{ untuk tekanan udara}$$

$$u_{t_A}(\rho_A)/\rho_A = -4 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1} \text{ untuk suhu udara}$$

$$u_{hr}(\rho_A)/\rho_A = -9 \times 10^{-3} \text{ untuk kelembapan relatif (dalam kasus ini satuannya adalah 1, bukan \%)}$$

5. Ketidakpastian dari penentuan nilai densitas anak timbangan acuan (u_{ρ_B})

Ketidakpastian baku densitas anak timbangan acuan dapat dianalisis berdasarkan data densitas anak timbangan acuan pada sertifikat kalibrasi. Sebagai alternatif, nilai ketidakpastian yang sesuai dengan kelas anak timbangan menurut dokumen OIML R111-1 [9] dapat digunakan.

Jika dokumen EURAMET cg 18 [10] digunakan dalam kalibrasi timbangan, ketidakpastian baku yang terkait dengan densitas anak timbangan sudah masuk kedalamnya dan pertimbangan lebih lanjut tidak diperlukan.

6. Ketidakpastian dari penentuan nilai efek *air cushion* ($u(\Delta V_{cush})$)

Berdasarkan informasi yang diberikan dari Panduan DKD-R 8-1[11], ketidakpastian dari penentuan nilai efek *air cushion* diakibatkan karena adanya proses termodinamika yang dimulai saat pengambilan volume dari ujung tip yang dicelupkan kedalam air dan berakhir ketika ujung tip dikeluarkan dari air. Nilainya bergantung pada ukuran *air cushion* (berkaitan dengan ketinggian pengangkatan pada ujung pipet), Beberapa hal yang mempengaruhi nilai efek *air cushion* antara lain:

- a. Perbedaan suhu air, mikropipet dan udara
- b. Kelembapan relatif
- c. Tekanan udara

Sedangkan untuk nilai ketidakpastian baku dari penentuan nilai efek *air cushion* dapat dihitung menggunakan Persamaan (20)

$$u(\Delta V_{cush}) = \left[\left(u(V\Delta p) \times c_{V\Delta p} \right)^2 + \left(u(V\Delta h_r) \times c_{V\Delta h_r} \right)^2 + \left(u(V\Delta t_s) \times c_{V\Delta t_s} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (20)$$

Dimana

$u(V\Delta p)$ = Estimasi ketidakpastian yang berkaitan dengan variasi tekanan udara selama kalibrasi

$u(V\Delta h_r)$ = Estimasi ketidakpastian yang berkaitan dengan variasi kelembapan selama kalibrasi

$u(V\Delta t_s)$ = Estimasi ketidakpastian akibat variasi suhu air, suhu udara dan suhu mikropipet selama proses kalibrasi

$c_{V\Delta p}$ = Koefisien sensitivitas terkait variasi tekanan udara. Pada tekanan 1008 hPa volume nominal 1000 μ l sekitar 0.014 μ l/hPa 100 μ l sekitar 0.0012 μ l/hPa, pada volume nominal 10 μ l, 0.0003 μ l/hPa

$c_{V\Delta h_r}$ = Koefisien sensitivitas terkait variasi kelembapan udara. Pada volume nominal 1000 μ l dan 100 μ l sekitar 0.07% μ l / 10 % RH, pada volume nominal 10 μ l, 0.1% μ l / 10 % RH

$c_{V\Delta t_s}$ = Koefisien sensitivitas terkait variasi suhu. Pada volume nominal 1000 μ l dan 100 μ l sekitar 0.22% / $^{\circ}$ C, pada volume nominal 10 μ l, 0.19% / $^{\circ}$ C

Variasi setiap parameter ditentukan secara eksperimental selama kalibrasi. Koefisien sensitivitas pada volume nominal yang tidak disebutkan, memiliki perbedaan yang kecil dari nilai diatas. [12]

7. Ketidakpastian dari penentuan nilai koefisien muai termal (u_{γ})

Ketidakpastian baku yang terkait dengan koefisien muai termal γ bergantung pada referensi tentang material dan data dari mikropipet yang digunakan. Data dari literatur atau pabrikan dapat digunakan untuk koefisien muai termal dan nilai ini memiliki ketidakpastian baku relatif sebesar 5% hingga 10% dari nilai koefisien muai termal.

Untuk mikropipet yang memiliki *air cushion*, efek termal pada koefisien muai termal dan *air cushion* saling berkaitan dan dipertimbangkan bersamaan atau ditentukan secara eksperimental.

8. Ketidakpastian resolusi ($u_{V_{res}}$)

Ketidakpastian dari resolusi mikropipet dapat ditentukan menggunakan Persamaan (21)

$$u(V_{res}) = \frac{\Delta res}{\sqrt{12}} \quad (21)$$

dimana Δres merupakan resolusi aktual atau estimasi resolusi dari volume nominal yang dipilih. Ketidakpastian ini dimasukkan kedalam bujet ketidakpastian apabila mikropipet dalam penggunaannya melakukan pembacaan langsung volume yang dikeluarkan.

9. Ketidakpastian dari setting ($u_{V_{setting}}$)

Jika memungkinkan, ketidakpastian dari setting mikropipet juga diestimasi dan disertakan dalam perhitungan. Ketidakpastian dari setting mikropipet dapat dihitung dengan Persamaan (21) sama dengan ketidakpastian resolusi.

10. Ketidakpastian dari pengukuran berulang ($u_{\delta V_{rep}}$)

Ketidakpastian pengukuran volume yang terkait dengan pengaliran air destilasi dianalisis berdasarkan nilai standar deviasi pengukuran. Ketidakpastian baku dihitung menggunakan Persamaan (22).

$$s_r(V_{ref}) = \frac{s_r}{\sqrt{n}} \quad (22)$$

dengan,

$s_r(V_{ref})$ = standar deviasi dari serangkaian pengukuran volume (ml)

n = banyak data hasil pengukuran

Untuk menghindari ketidakpastian estimasi yang terlalu kecil, kontribusi pengulangan $S_r(V_{ref}) = S_r$ dapat diganti untuk Persamaan (22).

11. Ketidakpastian dari pengaruh operator ($u_{\delta V_{operator}}$)

Selama pengambilan data kalibrasi mikropipet, operator memiliki pengaruh terhadap hasil data kalibrasi yang diperoleh dan berkontribusi dalam ketidakpastiannya. Ada beberapa metode untuk menentukan kontribusi ketidakpastian ini:

- Laboratorium dapat melakukan pengukuran secara berkala
- Berdasarkan DKD-R 8-1 [11], pengaruh operator memiliki kontribusi:
 - o Minimal 0.07% dari volume nominal pada mikropipet *single-channel* dengan *fixed-volume*
 - o Untuk mikropipet *single-channel* dengan *variable-volume* dan pipet *multi-channel*, pengaruh operator sebesar 0.1% dari volume nominal

Koefisien Sensitivitas

Koefisien sensitivitas merupakan turunan parsial dari Persamaan (1). Untuk memudahkan perhitungan koefisien sensitivitas, penggunaan Z sebagai substitusi dari

$$Z = \frac{1}{\rho_W - \rho_A} \times \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_B}\right)$$

sehingga, koefisien sensitivitas untuk masing-masing sumber ketidakpastian adalah sebagai berikut:

1. Massa

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial m} = Z \times [1 - \gamma(t_W - t_{ref})]$$

2. Suhu air destilasi

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial t} = m \times Z \times (-\gamma)$$

3. Densitas air destilasi

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \rho_W} = -m \times \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_B}\right) \times [1 - \gamma(t_W - t_{ref})] \times \frac{1}{(\rho_W - \rho_A)^2}$$

4. Densitas udara

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \rho_A} = m \times [1 - \gamma(t_W - t_{ref})] \times \frac{1}{\rho_W - \rho_A} \times \left(Z - \frac{1}{\rho_B} \right)$$

5. Densitas anak timbangan acuan

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \rho_B} = m \times \frac{1}{\rho_W - \rho_A} \times [1 - \gamma(t_W - t_{ref})] \times \frac{\rho_A}{\rho_B^2}$$

6. Efek bantalan udara (*air cushion*)

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial V_{cush}} = 1$$

7. Koefisien muai termal

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \gamma} = m \times Z \times [-(t_W - t_{ref})]$$

8. Resolusi

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \delta V_{res}} = 1$$

9. Setting

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \delta V_{setting}} = 1$$

10. Pengukuran berulang

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \delta V_{rep}} = 1$$

11. Pengaruh operator

$$\frac{\partial V_{ref}}{\partial \delta V_{operator}} = 1$$

Ketidakpastian Baku Gabungan (u_c)

Ketidakpastian baku gabungan dari volume pada suhu acuan dihitung menggunakan Persamaan (23).

$$u_c(V_{ref}) = [\sum_i c_i^2 \times u^2(x_i)]^{1/2} \quad (23)$$

Derajat Kebebasan Efektif (v_{eff})

Derajat kebebasan efektif dapat dihitung menggunakan Persamaan (24).

$$v_{eff} = \frac{u_c^2}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4}{v_i}} \quad (24)$$

dengan u_i dan v_i adalah ketidakpastian baku dan derajat kebebasan dari masing-masing sumber ketidakpastian.

Faktor Cakupan (k)

Faktor cakupan (k) merupakan faktor numerik yang digunakan sebagai pengali dari ketidakpastian baku gabungan untuk mendapatkan ketidakpastian bentangan. Faktor cakupan dapat dihitung menggunakan Persamaan (25).

$$k = 1,95996 + 2,37356/v_{eff} + 2,818745/v_{eff}^2 + 2,546662/v_{eff}^3 + 1,761829/v_{eff}^4 + 0,245458/v_{eff}^5 + 1,000764/v_{eff}^6 \quad (25)$$

Ketidakpastian Bentangan (U)

Ketidakpastian bentangan dihitung berdasarkan ketidakpastian baku gabungan dan faktor cakupan menggunakan Persamaan (26).

$$U(V_{ref}) = k \times u_c(V_{ref}) \quad (26)$$

13. Pelaporan Hasil Kalibrasi

Format pelaporan hasil kalibrasi harus sesuai dengan persyaratan umum dan persyaratan khusus untuk pelaporan hasil kalibrasi yang tercantum dalam dokumen SNI ISO/IEC 17025:2017.

Hasil kalibrasi yang dilaporkan yaitu volume nominal yang dikalibrasi, koreksi, kesalahan sistematis dan acak (*systematic and random error*) dan ketidakpastiannya. Nilai ketidakpastian pengukuran dituliskan maksimal dalam 2 angka penting. Pelaporan nilai koreksi mengikuti jumlah digit dari nilai ketidakpastian.

Pembulatan nilai ketidakpastian hasil kalibrasi sebaiknya dilakukan pembulatan ke atas. Sedangkan nilai hasil kalibrasi (koreksi), pembulatan dapat dilakukan secara matematis.

Dalam pelaporan hasil kalibrasi info detail dari mikropipet dan dapat dicantumkan, seperti suhu acuan, *MPE* dan koefisien muai termal mikropipet.

14. Contoh kalibrasi mikropipet

Dalam panduan ini diberikan satu contoh kalibrasi mikropipet *fixed-volume* dengan nominal 100 µl (untuk mikropipet tipe lain analisis perhitungan hampir sama dengan *fixed-volume*). Mikropipet akan dikalibrasi dengan metode gravimetrik menggunakan air destilasi. Data-data pengukuran yang diberikan pada dokumen ini dapat digunakan sebagai verifikasi metode dan *file* pengolahan data. Berikut adalah data-data identitas mikropipet, standar dan peralatan lainnya, serta data pengukuran.

14.1. Unit under test (UUT)

UUT	: Mikropipet
Type	: <i>Fixed-volume</i>
Volume Nominal	: 100 µl
Suhu Acuan	: 20 °C

14.2. Standar dan peralatan lainnya

Timbangan dan peralatan lainnya yang digunakan dalam kalibrasi mikropipet di atas, diuraikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Spesifikasi peralatan standar kalibrasi mikropipet

Peralatan	Resolusi	Ketidakpastian ($k=2$)
Timbangan kapasitas 220 g (mg)	0,01	0,05
Termometer cairan (°C)	0,1	0,12
Termometer lingkungan (°C)	0,01	0,3
Higrometer (%RH)	1	2,3
Barometer (mbar)	0,1	0,2
Stopwatch (s)	1	-

14.3. Data pengukuran

Data pengukuran pada kalibrasi mikropipet terdiri dari pengukuran kondisi lingkungan, dan penimbangan air destilasi.

a. Pengukuran kondisi lingkungan

Pengukuran kondisi lingkungan dilakukan selama proses kalibrasi dan diambil nilai minimum dan maksimumnya. Nilai kondisi lingkungan digunakan untuk menghitung nilai densitas udara pada saat kalibrasi. Nilai pengukuran kondisi lingkungan ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Kondisi lingkungan minimum dan maksimum selama kalibrasi

	Suhu udara (°C)	Kelembapan (%RH)	Tekanan (mbar)	Suhu Air Destilasi (°C)
Minimum	22,81	42,2	1010,2	22,6
Maksimum	22,92	43,3	1010,9	22,7
Rata-rata	22,87	42,75	1010,55	22,65

b. Penimbangan

Penimbangan dilakukan dengan mencatat nilai saat sebelum pengaliran air destilasi dan setelah pengaliran air destilasi. Skema data penimbangan mikropipet ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Penimbangan air destilasi pada kalibrasi mikropipet

Penimbangan ke-	mL (mg)
m-00	0,00
m-0	0,00
m-1	99,36
m-2	99,01
m-3	99,23
m-4	99,41
m-5	99,13
m-6	99,02
m-7	99,21
m-8	99,01
m-9	99,21
m-10	99,41
m-11	99,38

Catatan : pada data pengukuran kalibrasi ini nilai m_E bernilai 0 karena saat kalibrasi dilakukan proses di-nol-kan (*tare*) pada timbangan. Nilai m-00, m-0, m-10 dan m-11 akan digunakan untuk perhitungan nilai evaporasi.

14.4. Analisis hasil kalibrasi

Analisis hasil kalibrasi dilakukan untuk mendapatkan nilai volume aktual pada suhu acuan. Analisis dilakukan berdasarkan data pengukuran yang terdapat pada Tabel 6. Perhitungan nilai volume aktual pada suhu acuan (suhu acuan pada mikropipet yang dikalibrasi adalah 20 °C) dilakukan menggunakan Persamaan (1) dengan terlebih dahulu menghitung massa evaporasi selama kalibrasi menggunakan Persamaan (2).

$$\begin{aligned} m_{evap} &= \frac{(m_{00} - m_0) + (m_n - m_{n+1})}{2} \\ &= \frac{(0 - 0) + (99,41 - 99,38)}{2} = 0,015 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Nilai densitas air destilasi dihitung menggunakan Persamaan (3) dengan t merupakan rata-rata dari suhu air destilasi maksimum dan minimum selama kalibrasi.

$$\begin{aligned} \rho_w &= a_5 \left[1 - \frac{(t + a_1)^2 (t + a_2)}{a_3 (t + a_4)} \right] \\ &= 0,999\,974\,950 \left[1 - \frac{(22,65 - 3,983\,035)^2 (22,65 + 301,797)}{522\,528,9 (22,65 + 69,348\,81)} \right] \\ &= 0,9976 \text{ mg}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Hasil perhitungan densitas air destilasi diatas perlu dikoreksi dengan menggunakan Persamaan (4).

$$\begin{aligned} \Delta\rho &= s_0 + s_1 t \\ &= -4,612 \times 10^{-6} + 0,106 \times 10^{-6} \times (22,65) = -2,211 \times 10^{-6} \text{ mg}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Karena nilai koreksi sangat kecil dibandingkan dengan nilai densitas air destilasi dan nilai $\rho + \Delta\rho \approx \rho$, sehingga nilai densitas air destilasi yang sudah dikoreksi didapat $\rho + \Delta\rho \approx \rho = 0,9976 \text{ mg}/\mu\text{l}$.

Nilai densitas udara dihitung dengan menggunakan Persamaan (5) dengan p , h_r dan t merupakan rata-rata dari nilai minimum dan maksimum kondisi lingkungan selama kalibrasi.

$$\rho_A = \frac{0,348\,48 (p) - 0,009 (h_r) \exp(0,061 (t))}{t + 273,15}$$

$$= \frac{0,34848(1010,55) - 0,009(42,75) \exp(0,061(22,87))}{22,87 + 273,15}$$

$$= 0,001184 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

Analisis hasil kalibrasi untuk data pengukuran ke 1 sampai ke 10 ditunjukkan pada Tabel 7. Volume pada suhu acuan 20 °C dari mikropipet yang dikalibrasi dapat dihitung menggunakan Persamaan (1), berikut ini diberikan contoh penentuan nilainya pada Penimbangan ke R-1.

$$V_{ref} = (m_L - m_E + m_{evap}) \times \frac{1}{(\rho_W - \rho_A)} \times \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_B}\right) \times [1 - \gamma(t_w - t_{ref})]$$

$$V_{ref} = (99,36 + 0,015) \times \frac{1}{(0,9976 - 0,001184)} \times \left(1 - \frac{0,001184}{8,00}\right)$$

$$\times [1 - 0,00024(22,65 - 20)]$$

$$V_{ref} = 99,652 \mu\text{l}$$

Tabel 7. Analisis hasil kalibrasi

Penimbangan ke-	$m_L - m_E$ (mg)	m_{evap} (mg)	$(m_L - m_E + m_{evap})$ (mg)	Densitas air destilasi terkoreksi (mg/ μl)	Volume pada suhu acuan 20 °C (μl)
R-1	99,36	0,015	99,375	0,9976	99,652
R-2	99,01		99,025		99,301
R-3	99,23		99,245		99,522
R-4	99,41		99,425		99,702
R-5	99,13		99,145		99,422
R-6	99,02		99,035		99,311
R-7	99,21		99,225		99,502
R-8	99,01		99,025		99,301
R-9	99,21		99,225		99,502
R-10	99,41		99,425		99,702
	Rata-rata		99,215		99,492
	Sr		0,158		0,158

Berdasarkan Tabel 7, diperoleh nilai volume rata-rata pada suhu acuan (20 °C) sebesar 99,49 μl dengan standar deviasi sebesar 0,16 μl .

Nilai kesalahan sistematis e_s dan kesalahan acak s_r dihitung dengan menggunakan Persamaan (7) dan Persamaan (9) sehingga didapat nilai sebagai berikut.

$$e_s = \bar{V} - V_s = 99,49 - 100 = -0,51 \mu\text{l}$$

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n-1}} = 0,16 \mu\text{l}$$

Jika kesalahan sistematis dan kesalahan acak dinyatakan kedalam persen, maka kesalahan sistematis η_s dan kesalahan acak C_V dihitung dengan menggunakan Persamaan (8) dan Persamaan (10) sehingga didapat nilai sebagai berikut.

$$\eta_s = 100\% \times \frac{(\bar{V} - V_s)}{V_s} = 100\% \times \frac{(99,49 - 100)}{100} = -0,51\%$$

$$C_V = 100\% \times \frac{s_r}{\bar{V}} = 100\% \times \frac{0,16}{100} = 0,16\%$$

14.5. Evaluasi ketidakpastian hasil kalibrasi

14.5.1. Analisis komponen ketidakpastian

Evaluasi ketidakpastian pengukuran dilakukan sesuai dengan uraian pada sub-judul 12.9 tentang Evaluasi Ketidakpastian Pengukuran. Analisis masing-masing sumber ketidakpastian diuraikan sebagai berikut:

a. Penimbangan massa air destilasi (u_m)

Nilai ketidakpastian baku massa baik $u(m_L)$ dan $u(m_E)$, diperoleh dari nilai ketidakpastian hasil kalibrasi timbangan ($k=2$) dan resolusi timbangan yang dianalisis menggunakan distribusi *rectangular*.

$$u(m_L) = u(m_E) = [u(\text{bal})^2 + u(\text{res})^2]^{\frac{1}{2}}$$

$$= \left[\left(\frac{0,05}{2} \right)^2 + \left(\frac{0,01/2}{\sqrt{3}} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} = 0,025 \text{ mg}$$

Jika dianggap korelasi penimbangan dapat diabaikan, nilai $\delta m = 0,012$ mg dengan distribusi *rectangular* dan nilai estimasi untuk ketidakpastian dari evaporasi adalah 10% dari m_{evap} , maka nilai ketidakpastian penimbangan massa air destilasi dapat dihitung menggunakan Persamaan (12).

$$\begin{aligned}
u_m &= [u^2(m_L) + u^2(m_E) + u^2(\delta m) + u^2(m_{evap})]^{1/2} \\
&= \left[(0,025)^2 + (0,025)^2 + \left(\frac{0,012/2}{\sqrt{3}} \right)^2 + \left(\frac{10\% \times 0,015}{\sqrt{3}} \right)^2 \right]^{1/2} = 0,0358 \text{ mg}
\end{aligned}$$

b. Suhu air destilasi (u_t)

Ketidakpastian baku suhu air destilasi diperoleh dari nilai ketidakpastian hasil kalibrasi termometer $U(ther) = 0,12$ °C dengan ($k = 2$) dan resolusi termometer cairan yang dianalisis menggunakan distribusi rectangular. Dalam contoh ini, jika dianggap bahwa nilai drift termometer $\delta t = 0,06$ °C dengan distribusi *rectangular*, maka nilai ketidakpastian pengukuran suhu air destilasi dapat dihitung menggunakan Persamaan (15).

$$\begin{aligned}
u(t_w) &= \left[\left(\frac{U(ther)}{k} \right)^2 + u^2(t_{res}) + u^2(\delta t) \right]^{1/2} \\
&= \left[\left(\frac{0,12}{2} \right)^2 + \left(\frac{0,1/2}{\sqrt{3}} \right)^2 + \left(\frac{0,06/2}{\sqrt{3}} \right)^2 \right]^{1/2} = 0,069 \text{ °C}
\end{aligned}$$

dengan mempertimbangkan perbedaan suhu antara suhu udara dan suhu air destilasi kurang dari 0,5 °C, maka:

$$u(\delta t_s) = \frac{0,5}{2\sqrt{3}} = 0,144 \text{ °C}$$

sehingga,

$$\begin{aligned}
u_t &= [u^2(t_w) + u^2(\delta t_s)]^{1/2} \\
&= [(0,069)^2 + (0,144)^2]^{1/2} = 0,160 \text{ °C}
\end{aligned}$$

c. Densitas air destilasi (u_{ρ_w})

Ketidakpastian baku densitas air destilasi diperoleh dari perhitungan pada Persamaan (16), dengan nilai variasi densitas air destilasi akibat variasi suhu $u(\rho_{w,t})$ dihitung

$$\begin{aligned}
\beta &= (-0,1176 \times t^2 + 15,846 \times t - 62,677) \times 10^{-6} \\
&= (-0,1176 \times 22,7^2 + 15,846 \times 22,65 - 62,677) \times 10^{-6} \\
&= 2,359 \times 10^{-4} / \text{°C}
\end{aligned}$$

sehingga

$$\begin{aligned} u(\rho_{W,t}) &= u(t_W) \times \beta \times \rho_W(t_W) \\ &= 0,069 \times (2,359 \times 10^{-4}) \times 0,9976 \\ &= 1,62 \times 10^{-5} \text{ mg/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

Pada kalibrasi ini air destilasi yang digunakan merupakan air destilasi *grade* 3, maka ketidakpastian dari kemurnian air $u(\delta\rho_W)$ dapat diabaikan. Namun jika air destilasi yang digunakan bukan air destilasi *grade* 3 berdasarkan ISO 3696, maka $u(\delta\rho_W)$ perlu diperhitungkan.

$$\begin{aligned} u(\rho_W) &= [u^2(\rho_{W,form}) + u^2(\rho_{W,t}) + u^2(\delta\rho_W)]^{1/2} \\ &= [(4,5 \times 10^{-7})^2 + (1,62 \times 10^{-5})^2 + (0)^2]^{1/2} = 1,62 \times 10^{-5} \text{ g/ml} \end{aligned}$$

d. Densitas udara (u_{ρ_A})

Ketidakpastian baku relatif densitas udara diperoleh dari perhitungan menggunakan Persamaan (19), dengan ketidakpastian barometer 20 Pa, termometer udara 0,3 °C dan higrometer 2,3% (0,023), sehingga nilai ketidakpastian densitas udara dapat dihitung,

$$\begin{aligned} u(\rho_A) &= \rho_A \times \left[\left(\frac{u_{p_A}(\rho_A)}{\rho_A} \times u(p_A) \right)^2 + \left(\frac{u_{t_A}(\rho_A)}{\rho_A} \times u(t_A) \right)^2 \right. \\ &\quad \left. + \left(\frac{u_{hr}(\rho_A)}{\rho_A} \times u(hr) \right)^2 + \left(\frac{u_{form}(\rho_A)}{\rho_A} \right)^2 \right]^{1/2} \\ u(\rho_A) &= 0,001\,184 \\ &\quad \times \left[\left((-4 \times 10^{-3}) \times (0,3) \right)^2 + \left((1 \times 10^{-5}) \times (20) \right)^2 \right. \\ &\quad \left. + \left((-9 \times 10^{-3}) \times (0,023) \right)^2 + (2,4 \times 10^{-4})^2 \right]^{1/2} \\ &= 1,47 \times 10^{-6} \text{ g/ml} \end{aligned}$$

e. Densitas anak timbangan acuan (u_{ρ_B})

Ketidakpastian baku densitas anak timbangan acuan diperoleh dari sertifikat kalibrasi densitas dari anak timbangan acuan (jika memungkinkan) atau dapat

diestimasi sesuai dengan bahan dari anak timbangan acuan [9] seperti pada Tabel 8.

Tabel 8. Estimasi nilai densitas berdasarkan material anak timbangan

Alloy/material	Assumed density	Uncertainty ($k = 2$)
Platinum	21 400 kg m ⁻³	± 150 kg m ⁻³
Nickel silver	8 600 kg m ⁻³	± 170 kg m ⁻³
Brass	8 400 kg m ⁻³	± 170 kg m ⁻³
Stainless steel	7 950 kg m ⁻³	± 140 kg m ⁻³
Carbon steel	7 700 kg m ⁻³	± 200 kg m ⁻³
Iron	7 800 kg m ⁻³	± 200 kg m ⁻³
Cast iron (white)	7 700 kg m ⁻³	± 400 kg m ⁻³
Cast iron (grey)	7 100 kg m ⁻³	± 600 kg m ⁻³
Aluminum	2 700 kg m ⁻³	± 130 kg m ⁻³

Berdasarkan Tabel 8, dan diasumsikan bahwa material anak timbangan acuan adalah *Stainless steel*, maka nilai ketidakpastian baku densitas anak timbangan dihitung sebagai berikut:

$$u(\rho_B) = \frac{0,140}{2} = 0,070 \text{ g/ml}$$

f. Efek *air cushion* ($u(\Delta V_{cush})$)

Ketidakpastian baku akibat efek *air cushion* didapat secara eksperimental. Perubahan suhu relatif, tingkat kelembapan dan tekanan udara di dalam *air cushion* diperoleh melalui pengukuran di laboratorium.

Dari hasil pengukuran didalam laboratorium, nilai ketidakpastian baku akibat efek *air cushion* dari mikropipet yang dikalibrasi sebesar ($u(\Delta V_{cush}) = 6,2 \times 10^{-3} \mu\text{l}$).

g. Koefisien muai termal bahan (u_γ)

Koefisien muai termal (γ) dari mikropipet yang digunakan dalam kalibrasi yaitu $2,4 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. Ketidakpastian baku dianalisis sebesar 5% dari nilai koefisien tersebut menggunakan distribusi *rectangular*, sebagai berikut:

$$u_\gamma = \frac{5\% \times 2,4 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 6,928 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$$

h. Resolusi ($u_{\delta V_{res}}$)

Karena mikropipet yang dikalibrasi merupakan mikropipet *fixed-volume* (volume tetap) dan tidak adanya pembacaan langsung dari volume mikropipet, sehingga nilai ketidakpastian akibat resolusi ($u_{\delta V_{res}}$) = 0

i. Setting ($u_{\delta V_{setting}}$)

Pada mikropipet *fixed-volume* (volume tetap) tidak ada proses setting yang dilakukan, sehingga nilai ketidakpastian akibat setting ($u_{\delta V_{setting}}$) = 0

j. Repeatability ($u_{\delta V_{rep}}$)

Ketidakpastian baku pengukuran berulang (*repeatability*) dianalisis dengan tipe A, sebagai berikut:

$$u_{\delta V_{rep}} = S_r(V_{ref}) = \frac{S_r}{\sqrt{n}} = \frac{0,158}{\sqrt{10}} = 0,0501 \mu\text{l}$$

k. Pengaruh operator ($u_{\delta V_{operator}}$)

Karena tidak adanya data informasi pengaruh operator dari laboratorium, ketidakpastian baku akibat pengaruh operator diestimasi sebesar 0,07% dari volume yang dipilih

$$u_{\delta V_{operator}} = 0,07\% \times 100 = 0,07 \mu\text{l}$$

14.5.2. Koefisien sensitivitas

a. Massa

$$c_m = \frac{\partial V_{20}}{\partial m} = 1,00279 \text{ ml/g}$$

b. Suhu air destilasi

$$c_{tw} = \frac{\partial V_{20}}{\partial t} = -2,389 \times 10^{-2} \text{ ml/}^\circ\text{C}$$

c. Densitas air destilasi

$$c_{\rho_w} = \frac{\partial V_{20}}{\partial \rho_w} = -99,8475 \text{ ml}^2/\text{g}$$

d. Densitas udara

$$c_{\rho_A} = \frac{\partial V_{20}}{\partial \rho_A} = 87,4092 \text{ ml}^2/\text{g}$$

e. Densitas anak timbangan acuan

$$c_{\rho_B} = \frac{\partial V_{20}}{\partial \rho_B} = 1,842 \times 10^{-3} \text{ ml}^2/\text{g}$$

f. Efek *air cushion*

$$c_{\Delta V_{cush}} = \frac{\partial V_{20}}{\partial \Delta V_{cush}} = 1$$

g. Koefisien muai termal

$$c_{\gamma} = \frac{\partial V_{20}}{\partial \gamma} = -263,820 \text{ }^\circ\text{C.ml}$$

h. Resolusi

$$c_{res} = \frac{\partial V_{20}}{\partial V_{res}} = 1$$

i. Setting

$$c_{setting} = \frac{\partial V_{20}}{\partial V_{setting}} = 1$$

j. Pengukuran berulang (*Repeatability*)

$$c_{rep} = \frac{\partial V_{20}}{\partial V_{rep}} = 1$$

k. Pengaruh operator

$$c_{operator} = \frac{\partial V_{20}}{\partial V_{operator}} = 1$$

14.5.3. Bujet ketidakpastian

Bujet ketidakpastian kalibrasi mikropipet ditunjukkan pada Tabel 9.

Tabel 9. Bujet ketidakpastian kalibrasi mikropipet

Komponen	Satuan	Nilai	Distribusi	U_i	Pembagi	u_i	v_i	q_i	$(u_i \cdot q_i)^2$	$(u_i \cdot q_i)^4 / v_i$
Ketidakpastian akibat pengukuran gravimetrik										
Massa	mg	99,215	Normal	3,58E-02	1	3,58E-02	60	1,002 79	1,287E-03	2,76E-08
Suhu air destilasi	°C	22,65	Normal	1,60E-01	1	1,60E-01	60	-0,02389	1,460E-05	3,55E-12
Densitas air destilasi	mg/ μ l	0,9976	Normal	1,62E-05	1	1,62E-05	60	-99,8475	2,616E-06	1,14E-13
Densitas udara	mg/ μ l	0,001184	T-student	1,47E-06	1	1,47E-06	60	87,4092	1,658E-08	4,58E-18
Densitas AT acuan	mg/ μ l	8	Normal	1,40E-01	2	7,00E-02	60	0,001842	1,662E-08	4,60E-18
Efek air cushion	μ l	-	Rect.	6,2E-03	1	6,2E-03	50	1	3,844E-05	2,46E-11
Ketidakpastian terkait mikropipet (POVA)										
Koefisien muai termal	°C ⁻¹	$2,4 \times 10^{-4}$	Rect.	1,20E-05	1,73	6,93E-06	50	-263,8209	3,334E-06	2,23E-13
Resolusi	μ l	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Setting	μ l	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketidakpastian terkait penyaluran air destilasi										
Pengaruh operator	μ l	-	Rect.	0,07	1	0,07	50	1	0,0049	4,80E-07
Repeatability	μ l	-	Normal	5,01E-02	1	5,01E-02	9	1	2,51E-03	6,98E-07
<i>Sums</i>										8,75E-03
Ketidakpastian baku gabungan, u_c , ml										0,094
Derajat kebebasan efektif, v_{eff}										63,5
Faktor cakupan, k										2,00
Ketidakpastian bentangan, U , ml										0,19

14.6. Pelaporan hasil kalibrasi

Berdasarkan analisis hasil kalibrasi dan evaluasi ketidakpastian yang telah dilakukan, maka hasil kalibrasi dapat dilaporkan dengan format penulisan sebagai berikut:

Tabel 10. Pelaporan hasil kalibrasi pipet volume

Nominal (μl)	Koreksi (μl)	Kesalahan Sistematis			Kesalahan Acak			Ketidakpastian ($k=2$) (μl)
		η_s (%)	MPSE (%)	Status	C_V (%)	MPRE (%)	Status	
100	-0,51	-0,51	0,80	PASSED	0,16	0,30	PASSED	0,19

Pada Tabel 10, nilai ketidakpastian yang dilaporkan dituliskan dalam 2 angka penting dengan pembulatan ke atas (*round up*) dan penulisan nilai koreksi disesuaikan dengan jumlah digit dari nilai ketidakpastian.

Selain hasil kalibrasi pada Tabel 10, format laporan harus sesuai dengan persyaratan umum dan persyaratan khusus untuk laporan kalibrasi yang tercantum dalam dokumen SNI ISO/IEC 17025: 2017.

LAMPIRAN A

(Informatif)

Maximum Permissible Errors Mikropipet

Maximum permissible errors (mpe) adalah nilai kesalahan terbesar yang masih diijinkan pada mikropipet. Nilai mpe untuk masing-masing jenis mikropipet, sebagai berikut:

1. Mikropipet *single-channel*

Tabel 11. *Maximum permissible error* untuk mikropipet tipe A dan D1

Pipetting volume		Maximum permissible systematic error ^a	Maximum permissible random error ^a
Nominal volumes μl	Setting as a proportion of the nominal volume %	$\pm\%$	% ^b
1 to 3 ^c	100	2,5	2,0
	50	5,0	4,0
	10	25	20
> 3 to 5	100	2,5	1,5
	50	5,0	3,0
	10	25	15
> 5 to 10	100	1,2	0,8
	50	2,4	1,6
	10	12	8,0
> 10 to 50	100	1,0	0,5
	50	2,0	1,0
	10	10	5,0
> 50 to 5 000	100	0,80	0,30
	50	1,6	0,60
	10	8,0	3,0
> 5 000 to 20 000	100	0,60	0,30
	50	1,2	0,60
	10	6,0	3,0

^a To calculate errors in units of microlitres, multiply the maximum permissible errors by the selected volume.
^b Expressed as the coefficient of variation according to ISO 8655-6, ISO 8655-7, or ISO 8655-8.
^c Handling of such low volumes can be very challenging. For additional information refer to [Annex A](#).

Tabel 12. Maximum permissible error untuk mikropipet tipe D2

Pipetting volume		Maximum permissible systematic error ^a	Maximum permissible random error ^a
Nominal volumes μl	Setting as a proportion of the nominal volume %	$\pm\%$	% ^b
5 ^c	100	2,5	1,5
	50	5,0	3,0
	10	25	15
> 5 to 10	100	2,0	1,0
	50	4,0	2,0
	10	20	10
> 10 to 20	100	2,0	0,80
	50	4,0	1,6
	10	20	8,0
> 20 to 100	100	1,4	0,60
	50	2,8	1,2
	10	14	6,0
> 100 to 1 000	100	1,2	0,40
	50	2,4	0,80
	10	12	4,0

^a To calculate errors in units of microlitres, multiply the maximum permissible errors by the selected volume.
^b Expressed as the coefficient of variation according to ISO 8655-6, ISO 8655-7, or ISO 8655-8.
^c Handling of such low volumes can be very challenging. For additional information refer to [Annex A](#).

2. Mikropipet *multi-channel*

Tabel 13. Maximum permissible error untuk mikropipet tipe A dan D1

Pipetting volume		Maximum permissible systematic error ^a	Maximum permissible random error ^a
Nominal volumes μl	Setting as a proportion of the nominal volume %	$\pm\%$	% ^b
2 ^c	100	8,0	8,0
	50	16	16
	10	25	25
> 2 to 5	100	5,0	3,0
	50	10	6,0
	10	25	25
> 5 to 10	100	2,4	1,6
	50	4,8	3,2
	10	24	16
> 10 to 20	100	2,0	1,0
	50	4,0	2,0
	10	20	10
> 20 to 50	100	2,0	0,80
	50	4,0	1,6
	10	20	8,0
> 50 to 2 000	100	1,6	0,60
	50	3,2	1,2
	10	16	6,0

^a To calculate errors in units of microlitres, multiply the maximum permissible errors by the selected volume.
^b Expressed as the coefficient of variation according to ISO 8655-6, ISO 8655-7, or ISO 8655-8.
^c Handling of such low volumes can be very challenging. For additional information refer to [Annex A](#).

LAMPIRAN B

Spesifikasi Cairan Kalibrasi

Cairan kalibrasi yang digunakan untuk kalibrasi mikropipet adalah air destilasi atau air deionisasi dengan spesifikasi sebagai berikut:

Tabel 14. Spesifikasi air destilasi berdasarkan *grade*

Parameter	Grade 1	Grade 2	Grade 3
pH value at 25 °C inclusive range	Not applicable (see note 1)	Not applicable (see note 1)	5,0 to 7,5
Electrical conductivity mS/m at 25 °C, max.	0,01 (see note 2)	0,1 (see note 2)	0,5
Oxidizable matter Oxygen (O) content mg/l, max	Not applicable (see note 3)	0,08	0,4
Absorbance at 254 nm and 1 cm optical path length, absorbance units, max.	0,001	0,01	Not specified
Residue after evaporation on heating at 110 °C mg/kg, max.	Not applicable (see note 3)	1	2
Silica (SiO ₂) content mg/l, max.	0,01	0,02	Not specified

LAMPIRAN C

Contoh Sertifikat Kalibrasi

Spesifikasi Mikropipet/ Specifications of micropipette

Type : Fixed-Volume
Nominal : 100 μ l
No. Seri / Serial Number : YE198AL0531105
Merk Brand/ Pabrik Factory : Dragon Lab
Tipe tip/ Type of tip : -

Kalibrasi dilakukan di laboratorium SNSU-BSN dalam kondisi berikut, yang diukur dengan satu set sistem pengukuran densitas udara :

Calibration was performed in laboratory of SNSU-BSN under the following condition, as measured by a set of air density measurement system :

Temperatur udara *Air temperature* : (22,87 \pm 0.03) $^{\circ}$ C
Tekanan udara / *Air pressure* : (1010,6 \pm 0.20) hPa
Kelembaban rela *Relative humidity* : (42,7 \pm 2.3) %RH

Kalibrasi dilakukan menggunakan metode gravimetri berdasarkan prosedur I.MM.9.06 yang mengacu dokumen ISO 8655-6:2022

The calibration was performed using the gravimetric method based on I.MM.9.06 procedure that refers to ISO 8655-6:2022

Air destilasi digunakan sebagai cairan acuan dan nilai densitasnya ditentukan berdasarkan persamaan

The distilled water was used as the reference liquid and the density value was determined based on the Tanaka's

Ketidakpastian pengukuran yang dilaporkan adalah ketidakpastian bentangan pada tingkat kepercayaan sekitar 95% dengan faktor cakupan $k = 2$, yang dievaluasi berdasarkan

'Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement', JCGM 100: 2008

Uncertainty of measurement reported is expanded uncertainty at confidence level about 95% with $k = 2$, evaluated based on 'Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement', JCGM 100: 2008

Hasil yang dilaporkan merupakan pengukuran volume tipe Ex pada suhu acuan 20 $^{\circ}$ C dengan nilai koefisien muai termal sebesar 0,00024 / $^{\circ}$ C.

The reported results are Ex type volume measurements at reference temperature of 20 $^{\circ}$ C with cubic thermal expansion coefficient of 0.00024 / $^{\circ}$ C.

Hasil pengukuran yang dilaporkan tertelusur ke SI melalui Laboratorium SNSU-BSN, Indonesia

The result of reported measurement is traceable to SI through National Measurement Standards Laboratory-BSN.

HASIL KALIBRASI
CALIBRATION RESULT

Nominal <i>Nominal</i> μl	Koreksi <i>Correction</i> μl	Kesalahan Sitematik <i>Systematic Error</i>			Kesalahan Acak <i>Random Error</i>		
		η_s (%)	MPSE (%)	Status	Cv (%)	MPRE (%)	Status
100	-0,51	-0,51	0,80	PASSED	0,16	0,30	PASSED

Ketidakpastian ($k = 2$) dari koreksi adalah 0,19 μl

The uncertainty ($k = 2$) associated with the correction is

Tanggal Kalibrasi :

Calibration date

Pelaksana / *Calibration officer* :

Diperiksa oleh / *Checked by* :

Kepala Lab. Massa/ :

Head of Mass Laboratory

====akhir sertifikat / *end of certificate*====

File file:///home/xavier/Downloads/E-24-03-170 100 uL v1.xlsm

BIBLIOGRAFI

- [1] SNI ISO/IEC 17025. (2017). Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan kalibrasi.
- [2] ISO 8655-6. (2022). *Piston-operated volumetric apparatus — Part 6: Gravimetric reference measurement procedure for the determination of volume*
- [3] JCGM 100. (2008). *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement.*
- [4] ISO/TR 20461. (2023). *Determination of uncertainty for volume measurements of a piston-operated volumetric apparatus using a gravimetric method.*
- [5] ISO 8655-2. (2022). *Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Pipettes*
- [6] ISO 4787. (2021). *Laboratory glass and plastic ware — Volumetric instruments — Methods for testing of capacity and for use.*
- [7] EURAMET cg.19. (2018). *Guidelines on the determination of uncertainty in gravimetric volume calibration.*
- [8] A. Hantz, (2013). *Evaporation minimization at piston pipettes calibration by gravimetric method thanks to using evaporation trap*. Imeko 2013.
- [9] OIML R111-1. (2004). *Weights of classes E1, E2, F1, F2, M1, M1-2, M2, M2-3 and M3 – Part 1: Metrological and technical requirements.*
- [10] EURAMET cg.18. (2015). *Guidelines on the calibration of non-automatic weighing instruments.*
- [11] DKD-R 8-1 (12/2011). *Calibration of piston-operated pipettes with air cushion.*
- [12] DKD-E 8-2 (05/2013). *Analysis of influencing parameters on calibration of piston-operated pipettes with air cushions.*