

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan menggunakan metode eksperimental laboratorium yang ditujukan untuk mengetahui validasi metode analisis dan menetapkan kadar asam askorbat buah tomat pada beberapa varietas lokal dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengidentifikasi kebenaran dari tanaman tomat. Determinasi terhadap tanaman tomat dilakukan di Laboratorium Botani Yayasan Generasi Biologi Indonesia Gresik.
- b. Penelitian terkait validasi metode dan penetapan kadar asam askorbat pada beberapa varietas buah tomat lokal dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan, Universitas Ngudi Waluyo, Ungaran.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember- Januari 2022.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan beberapa varietas tomat lokal yang didapatkan dari petani tomat di Desa Kintelan, Kecamatan Pakis Kabupaten Magelang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan 3 (tiga) jenis buah tomat lokal dengan varietas yang berbeda yaitu Tomat Ceri Lokal, Tomat Servo F1 dan Tomat Ken Dedes.

D. Definisi Operasional

1. Validasi metode analisis adalah tindakan penilaian terhadap parameter linearitas, presisi, akurasi, LOD dan LOQ.
2. Tomat merupakan buah yang diambil dari Desa Kintelan.
3. Varietas lokal merupakan tumbuhan dengan jenis tomat Ceri, tomat Kendedes dan tomat Servo.
4. Asam askorbat adalah senyawa kimia yang mempunyai fungsi sebagai antioksidan serta merupakan vitamin yang mudah larut didalam air.
5. Metode Spektrofotometri UV-Vis adalah proses pembacaan absorban menggunakan panjang gelombang maksimal 265 nm.

E. Variabel dalam penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah buah tomat lokal yang diambil dari mitra pertanian di Dusun Kintelan, Kecamatan Pakis Kabupaten Magelang.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan pada penelitian ini adalah kadar asam askorbat (vitamin C) yang ada di buah tomat lokal.

3. Variabel terkontrol

Variabel kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah varietas buah tomat yang digunakan dan panjang gelombang spektrofotometri UV-Vis.

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuvet (Hellma Analytics), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800), neraca analitik (Ohaus), corong kaca, penyaring, blender (Miyako), pipet tetes, pipet volume 1 mL (Iwaki), 2 mL (Iwaki), dan 5 mL (Iwaki), *ball* pipet, labu ukur 500 mL(Iwaki), 100 mL (Iwaki) dan 50 mL (Iwaki), kertas saring, gelas ukur 10 mL (pyrex), *beaker glass* 250 mL (pyrex),*beaker glass* 100 mL (Herma) dan alumunium foil.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ascorbic Acid for analysis EMSURER® Batch K52406268 dari distributor Nitra Kimia, aquadestilata (*One Med*) dari CV. Mitra Medika dan buah tomat lokal varietas kendedes, Servo, dan Ceri.

3. Prosedur penelitian

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan kesesuaian dari tanaman tomat berdasarkan varietas. Determinasi terhadap tanaman tomat dilakukan di Laboratorium Botani Yayasan Generasi Biologi Indonesia Gresik.

b. Pengambilan sampel dan preparasi sampel

1.) Kriteria inklusi

Sampel buah tomat diambil di desa Kintelan Kecamatan Pakis Kabupaten Magelang yaitu buah tomat dengan varietas lokal yang berbeda dan siap panen dengan umur tumbuhan 73 hari. Buah tomat dipetik pada pagi hari.

2.) Preparasi sampel

Sampel buah tomat dicuci bersih dan bijinya dibuang, potong kecil-kecil dan dihaluskan dengan menggunakan blender. Setelah diblender, diambil untuk dibuat larutan dengan cara menimbang sebanyak 50 gram dan dilarutkan menggunakan aquadestilata dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda batas dan dihomogenkan. Langkah selanjutnya yaitu menyaring larutan dengan menggunakan kertas saring sehingga didapatkan filtrate

c. Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat 100 ppm

Larutan induk asam askorbat disiapkan dengan menimbang sebanyak 50 mg asam askorbat kemudian masukkan ke dalam labu ukur 500 mL dan dilarutkan dengan aquadestilata hingga tanda batas. Bungkus labu ukur dengan alumunium foil.

d. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan asam askorbat

Diambil larutan induk asam askorbat sebanyak 4 mL dan dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL kemudian tambahkan aquadestilata hingga tanda batas (konsentrasi 8 ppm). Larutan diukur

menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 200-400 nm dengan menggunakan blanko aquadestilata.

e. Penentuan *Operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mengambil larutan induk asam askorbat sebanyak 3 mL dan dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL kemudian tambahkan aquadestilata sampai tanda batas dan dihomogenkan (konsentrasi 6 ppm). Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit dan dilakukan pembacaan absorbansi selama 30 menit.

f. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dipipet larutan induk asam askorbat 100 ppm ke dalam labu ukur 50 mL masing- masing sebesar 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, dan 5 mL. Tambahkan aquadestilata hingga tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.

g. Pengukuran Larutan Kurva Kalibrasi

Absorbansi dari masing- masing larutan kurva kalibrasi pada konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan.

h. Validasi Metode Analisis

1. Linieritas

Penentuan nilai linearitas dilakukan dengan membaca serapan larutan standar konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10

ppm. Hasil dari pembacaan serapan dihitung dari persamaan garis (regresi linier) dan koefisien korelasinya.

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y : Absorbansi sampel

a : Slope

x : Konsentrasi sampel

b : Intersep

2. Uji Presisi

Uji presisi dilakukan menggunakan dua variasi yaitu pengujian secara *intraday* (dilakukan pada satu) dan *interday* (hari yang berbeda). Pengujian dilakukan dengan pengukuran masing-masing kurva kalibrasi kemudian masukkan ke dalam kuvet dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis, pengukuran dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan. Setelah itu dicari rata-rata dari hasil pembacaan absorbansi yang diperoleh. Selanjutnya ketelitian presisi ditentukan dari simpangan baku (SD) dan % RSD.

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

Keterangan :

SD : Standar Deviasi

X_i : Konsentrasi sampel

X : Rata-rata absorbansi sampel

n : Jumlah sampel

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{standar deviasi (SD)}}{\text{Harga rata-rata (X)}} \times 100\%$$

Keterangan :

X : Kadar rata-rata sampel

SD : Standar Deviasi

RSD : Relatif standar deviasi

3. LOD dan LOQ

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dihitung dari persamaan garis regresi linier kurva kalibrasi yang telah diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$\text{Limit of Detection (LOD)} = \frac{3 \times SD}{\text{Slope}}$$

$$\text{Limit of Quantitation (LOQ)} = \frac{10 \times SD}{\text{Slope}}$$

Keterangan :

SD : Standar deviasi (Simpangan baku)
respon analitika dari blanko

Slope : Arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap analisis blanko.

Konsentrasi : Slope (b pada persamaan garis $y = bx+a$)

4. Uji Akurasi

Disiapkan 3 labu ukur 50 mL. Sampel buah tomat yang telah diketahui kadarnya dipipet filtratnya sebanyak 10 mL, masukkan

kedalam labu ukur dan tambahkan sejumlah analit yang diambil dari larutan induk asam askorbat 100 ppm. Larutan sampel yang telah ditambahkan analit dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan alat spektrofotometer UV- Vis. Hasil akurasi dapat dihitung dengan memasukkan rumus :

$$Recovery (\%) = \frac{CF-CA}{C*A} \times 100\%$$

Keterangan :

CA : Konsentrasi sampel sebenarnya

CF : Konsentrasi total sampel hasil pengukuran

C*A : Konsentrasi analit yang ditambahkan

i. Penetapan Kadar Asam Askorbat pada Daging Buah Tomat Lokal

Dipipet larutan sampel sebanyak 5 mL dan dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL untuk dilakukan pembacaan absorbansi sampel. Replikasi dilakukan sebanyak 3 (tiga) kali pengulangan. Konsentrasi sampel kadar asam askorbat dihitung dengan persamaan regresi linier :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y : Absorbansi sampel

a : Slope

x : Konsentrasi sampel

b :Intersep

Untuk mendapatkan kadar % asam askorbat dalam sampel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$C_s = \frac{C \times F_p \times V}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

C_s = konsentrasi yang diperoleh dari persamaan regresi kurva kalibrasi (mg/gram)

C = Konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$)

F_p = Faktor pengenceran

W = Bobot sampel (gram)

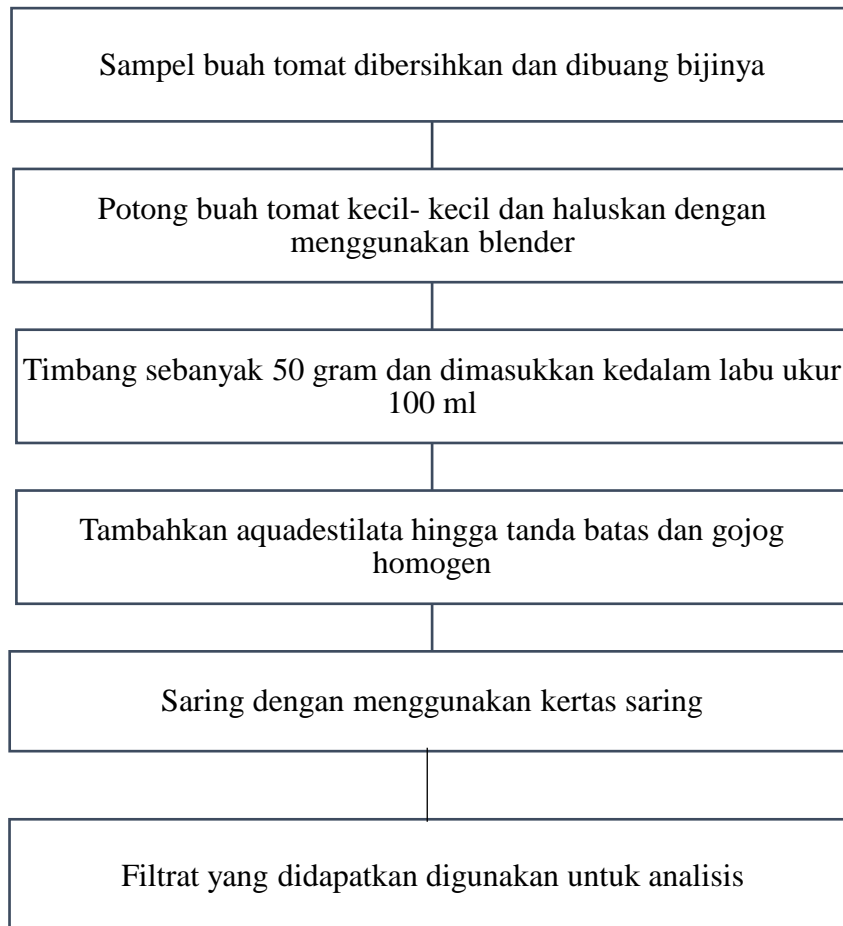
V = Volume labu ukur (mL)

G. Pengolahan Data

Hasil penelitian diperoleh data meliputi hasil linearitas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ, serta perhitungan penetapan kadar yang kemudian diolah dengan *software Microsoft excel* dan disajikan dalam bentuk tabel maupun grafik yang berujuan untuk memudahkan dalam menganalisis dan menentukan kesimpulan.

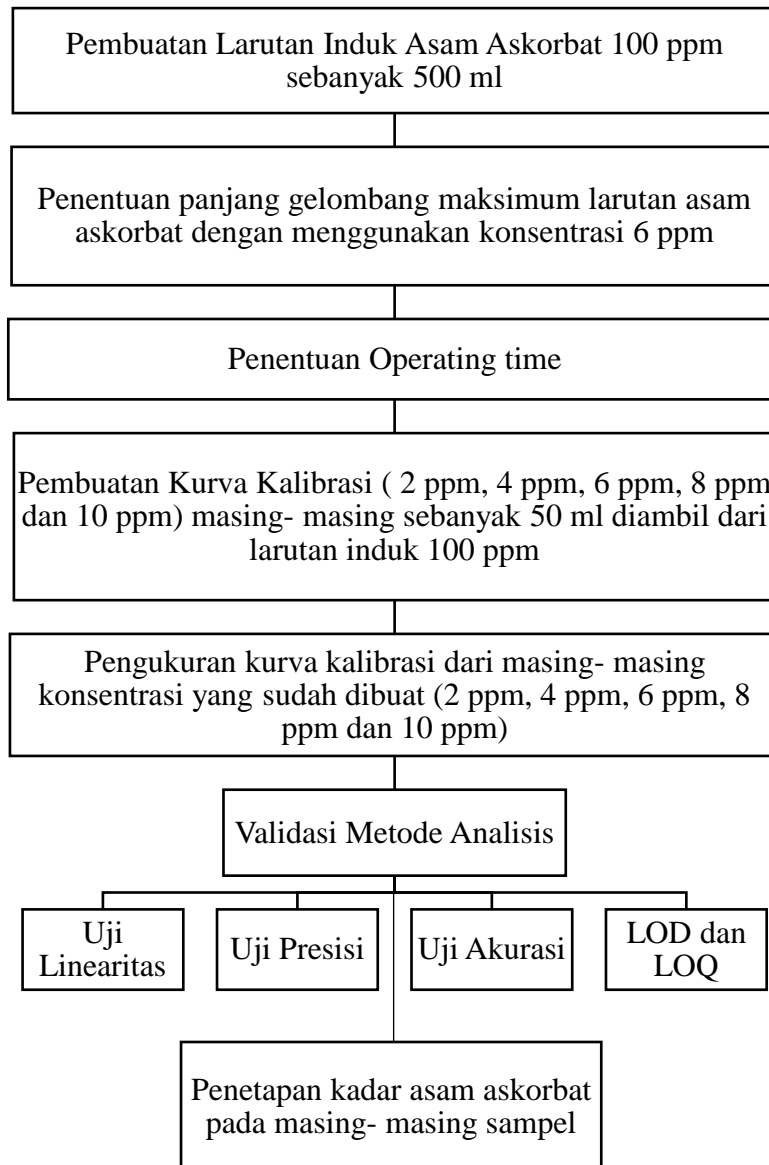
H. Skema Cara Kerja

1.) Preparasi sampel



Bagan 3. 1 Preparasi Sampel

2.) Skema validasi metode analisis dan penetapan kadar asam askorbat sampel



Bagan 3. 2 Skema Kerja Validasi metode analisis dan Penetapan Kadar asam askorbat sampel

I. Analisis Data

Data yang telah didapatkan dari penelitian terkait penetapan kadar pada beberapa sampel buah tomat varietas lokal akan disajikan secara deskriptif dan uji statistik dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test software Statistical Product and Service Solutions 21 (SPSS 21)*. Pemilihan menggunakan uji Kruskal-Wallis dalam penelitian ini dikarenakan terdapat sebaran data yang tidak terdistribusi normal, sehingga sebagai alternatif analisis data secara statistika menggunakan *nonparametrik* dengan uji ini (Romie Priyastama, 2017). Uji statistik dengan menggunakan Kruskal-Wallis digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan dari masing-masing kadar asam askorbat dalam sampel secara signifikan. Signifikansi nilai ditentukan dengan taraf signifikansi 0,05.