

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium yang memberikan gambaran hasil penelitian berdasarkan data yang didapat. Metode ini dilakukan untuk mengetahui adanya Rhodamin B pada kerupuk yang dijual di Pasar Bandarjo dan Pasar Babadan.

B. Lokasi Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Kabupaten Semarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November – Februari 2023 dimulai dari penyusunan proposal penelitian.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Pada penelitian ini menggunakan populasi sampel kerupuk berwarna merah yang dijual di Pasar Bandarjo dan Pasar Babadan.

2. Sampel

Penentuan jumlah sampel pada penelitian ini diambil secara *random sampling* atau secara acak dari beberapa pedagang kerupuk berwarna merah yang berada di Pasar Bandarjo dan Pasar Babadan.

D. Kriteria Sampel

1. Kriteria Inklusi

Kerupuk yang berwarna merah, mengkilap dan lebih mencolok. Terkadang warna terlihat tidak homogen (rata), jika dikonsumsi rasanya sedikit pahit, tidak mencantumkan merk dan registrasi BPOM.

2. Kriteria Eksklusi

Kerupuk dengan warna merah natural, dijual di Pasar Bandarjo dan Pasar Babadan, memiliki merk dan registrasi BPOM.

E. Definisi Operasional

1. Kerupuk yang menjadi sampel diperoleh dari Pasar Bandarjo dan Pasar Babadan.
2. Rhodamin B adalah pewarna sintetis yang digunakan sebagai pewarna tekstil, namun sering disalah gunakan sebagai pewarna makanan.
3. Kromatografi Lapis Tipis adalah teknik yang dilakukan untuk analisis kualitatif, digunakan untuk mendeteksi suatu senyawa pada sampel menggunakan fase diam plat KLT (silika gel GF254) dan fase gerak etanol 90% : asam asetat 6% : aquadest (12:6:7).
4. Spektrofotometri UV-Vis merupakan satu metode analisis digunakan dalam analisis kimia untuk mendeteksi senyawa (padat/cair) pada panjang gelombang 400-600 nm.
5. Parameter validasi metode analisis yang di ujikan meliputi linearitas presisi, akurasi, batas deteksi (*Limit of Detection*) dan batas kualifikasi (*Limit of Qualification*).

F. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa sampel kerupuk KA, KB, KC, KD, KE, KF, KG, KH yang dijual di Pasar Bandarjo dan Pasar Babadan.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah validasi metode, adanya kandungan Rhodamin B, dan kadar pewarna Rhodamin B.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu pemanasan, fase gerak, *operating time*, panjang gelombang Spektrofotometri UV-Vis, dan kurva kalibrasi.

G. Pengumpulan Data

Pengumpulan data pada penelitian ini diperoleh dari menganalisis Bahan Tambah Pangan (BTP) Pewarna Rhodamin B pada kerupuk yang dilakukan di laboratorium instrument Universitas Ngudi Waluyo dengan metode Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri UV-Vis. Prinsip yang digunakan yaitu analisis kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri UV-Vis berdasarkan nilai R_f , panjang gelombang maksimal yang diperoleh, dan nilai absorbansi pada sampel.

H. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, Erlenmeyer, corong kaca, labu takar, gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, pipet ukur, pipa kapiler, batang pengaduk, kertas saring (*Whatman No.1*), *chamber*, *Hot plate*, Lempeng KLT (silika gel GF254), Spektrofotometer UV-Vis.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 8 macam kerupuk yang diperoleh dari Pasar Bandarjo dan Pasar Babadan, baku pembanding Rhodamin B, benang wol, aquadest, etanol 70%, etanol 90%, asam klorida, ammonia, asam asetat 6%.

I. Prosedur Penelitian

1. Uji Organoleptis

Sampel Kerupuk (KA, KB, KC, KD, KE, KF, KG, KH) masing-masing di uji organoleptis dengan cara mengamati karakteristik sampel yang meliputi warna, bau, dan rasa menggunakan panca indra.

2. Preparasi Sampel KA, KB, KC, KD, KE, KF, KG, KH

Mengambil sampel kerupuk berwarna merah sebanyak 20 gram, kemudian diblender hingga halus. Menimbang sampel kerupuk sebanyak 10 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer, kemudian direndam dalam 40 ml larutan ammonia 2% (yang dilarutkan dalam etanol 70%) dibiarkan semalaman. Larutan filtrat disaring menggunakan kertas saring *Whatman*

No.1, kemudian larutan dipindahkan ke dalam gelas beker dan dipanaskan di atas *hot plate*. Residu dari penguapan dilarutkan dalam 10 ml larutan asam yang dibuat dengan mencampurkan 10 ml air dan 5 ml asam asetat 10%. Menyiapkan benang wol dengan panjang 15 cm dimasukkan kedalam larutan asam dan didihkan hingga 10 menit, pewarna akan mewarnai benang wol, kemudian benang diangkat. Benang wol dicuci dengan air, kemudian benang dimasukkan kedalam larutan basa yaitu 10 ml ammonia 10% yang dilarutkan dalam etanol 70% dan didihkan. Benang wol akan melepaskan pewarna, kemudian pewarna akan masuk kedalam larutan basah, larutan basah yang didapat selanjutnya akan digunakan sebagai cuplikan sampel pada analisis Kromatografi Lapis Tipis (Dawile *et al.*, 2013).

3. Analisis Kualitatif

a. Kromatografi Lapis Tipis

Menyiapkan plat KLT berukuran 14 x 5 cm kemudian diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Chamber dijenuhkan terlebih dahulu dengan eluen etanol 90%: asam asetat 6%: aquadest (12:6:7) sampel ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari bagian bawah plat, jarak antara noda adalah 1 cm. Plat KLT dimasukkan kedalam chamber yang telah jenuh dengan eluen, ditutup dan dibiarkan beberapa saat sampai eluen naik sampai tanda batas plat, kemudian plat KLT diangkat dan dikeringkan. Diamati warna secara

visual dibawah sinar UV, jika secara visual noda berwarna merah jambu dan dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm berfluoresensi kuning atau orange, hal ini menunjukkan adanya Rhodamin B. Dihitung nilai Rf dari masing-masing bercak noda tersebut, dengan cara membagi jarak gerak zat terlarut oleh jarak zat pelarut. Jika $R_f = 1$ berarti zat warna tersebut adalah Rhodamin B (Dawile *et al.*, 2013).

b. Spektrofotometri UV-Vis

1) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Rhodamin B.

Dipipet 0,2 ml larutan Rhodamin B 120 ppm dengan menggunakan pipet ukur dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml (konsentrasi 2,4 ppm), lalu ditambahkan HCl 0,1 N sampai tanda batas dan dihomogenkan. Diukur serapan maksimum pada panjang gelombang 400-600 nm dengan menggunakan blangko. Larutan yang digunakan adalah HCl 0,1 N.

2) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Sampel

Ditimbang 10 gram sampel KA, KB, KC, KD, KE, KF, KG dan KH dan masing-masing ditambahkan ammonia 2% dan didiamkan semalaman. Setelah direndam semalaman kemudian disaring, selanjutnya diukur serapan maksimumnya pada panjang gelombang 400-600 nm dengan menggunakan larutan blanko HCl 0,1 N. Setelah diukur panjang gelombang maksimumnya selanjutnya dibandingkan hasilnya dengan panjang gelombang maksimum larutan baku Rhodamin B.

4. Validasi Metode

a. Pembuatan Larutan Baku Rhodamin B 1000 ppm

Ditimbang 50 mg baku Rhodamin B dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml. Ditambahkan aquadest secukupnya dan dikocok hingga homogen. Kemudian larutan ditambahkan HCl 0,1 N hingga tanda batas dan dihomogenkan.

b. Pembuatan Larutan Rhodamin B 120 ppm

Dipipet 1,2 ml larutan Rhodamin B 1000 ppm dengan menggunakan pipet ukur, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml lalu ditambahkan HCl 0,1 N sampai tanda batas dan homogenkan.

c. Penentuan *Operating Time* Larutan Rhodamin B

Dipipet 0,2 ml larutan baku Rhodamin B 120 ppm dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml (konsentrasi 2,4 ppm), lalu ditambahkan HCl 0,1 N sampai tanda batas dan homogenkan. Selanjutnya diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada menit ke 0 sampai ke 30.

d. Linearitas

Penentuan nilai linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi seri konsentrasi larutan baku Rhodamin B yaitu 1,2; 1,8; 2,4; 3,0; 3,6; 4,2 ppm pada panjang gelombang maksimum menggunakan larutan blanko HCl 0,1 N. Hasil persamaan regresi linier digunakan untuk pengukuran absorbansi dan perhitungan koefisien korelasinya.

$$Y = bx + a$$

Keterangan:

Y = Absorbansi sampel

b = Slope

x = Konsentrasi sampel

a = Intersep

a. Presisi

Pengujian presisi dilakukan dengan metode pengulangan (*repeatability*) dilakukan pada konsentrasi 2,4 ppm. Uji presisi dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 557 nm, selanjutnya dilakukan penghitungan relatif standar deviasi (RSD) nya.

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

Keterangan :

SD = Standar diviasi

x = Konsentrasi sampel

\bar{X} = Rata-rata absorbansi sampel

N = Jumlah sampel

$$RSD = \frac{\text{Standar Deviasi (SD)}}{\text{Rata-rata (x)}} \times 100\%$$

Keterangan :

RSD = Relatif standar deviasi

SD = Standar deviasi

x = Rata-rata sampel

e. Akurasi

Penentuan akurasi ditentukan dengan metode penambahan sampel simulasi yaitu dengan menambahkan baku Rhodamin B dengan konsentrasi 2,4 ppm; 3,0 ppm; 3,6 ppm yang dilakukan 3 kali pengulangan, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan dihitung nilai % *recovery*.

$$\% Recovery = \frac{(C_F - C_A)}{C^*_A} \times 100\%$$

Keterangan :

C_F = Konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = Konsentrasi dari pengukuran

C^*_A = Konsentrasi analit yang ditambahkan

f. LOD dan LOQ

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

$$LOD = \frac{3 Sy-x}{S1}$$

$$LOQ = \frac{10 Sy-x}{S1}$$

Keterangan :

S (y/x) = Simpangan baku

S1 = Arah garis linier

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

J. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan secara deskriptif yang meliputi uji organoleptis, uji kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis dilakukan dengan mengamati bercak dan dihitung hasil nilai Rf yang diperoleh (Rf sampel dan Rf larutan baku), dan Spektrofotometri UV-Vis dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar, serta secara analitik yakni menggunakan regresi linear. Persamaan garis regresi : $y = bx + a$, dimana $y =$ serapan, $x =$ konsentrasi (ppm), $a =$ konstanta, dan $b =$ slope/kemiringan.