

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah model desain eksperimental. Penelitian eksperimental dilakukan untuk meneliti pengaruh suatu/beberapa perlakuan terhadap perilaku yang timbul sebagai akibat dari perlakuan tersebut. Hal yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dengan alat Spektrofotometer UV-Vis untuk menganalisis pengaruh lama perebusan kubis putih pada kubis putih tanpa perebusan, serta kubis putih dengan lama perebusan 5 menit dan 15 menit, terhadap kadar nitrit.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo. Penelitian dilakukan pada bulan Juni - Juli 2023.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah sumber utama penelitian yaitu yang memiliki data mengenai variabel-variabel yang diteliti. Subjek dalam penelitian ini berupa popuasi dan sampel, sebagai berikut:

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah sayur kubis putih yang didapatkan dari Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah kubis putih dari salah satu penjual di Pasar Bandarjo, Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah, yang dengan perlakuan tanpa perebusan, direbus 5 menit dan 15 menit.

D. Definisi Operasional

Berikut adalah definisi operasional dari penelitian ini:

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
Kadar nitrit dalam kubis putih tanpa direbus, direbus 5 menit dan 15 menit	Senyawa kimia dengan unsur N dan O yang terdapat di dalam kubis putih yang terdapat dalam kubis putih tanpa direbus, direbus 5 menit dan 15 menit.	Spektrofotometer UV-Vis	Nominal
Suhu perebusan 90°C	Proses pemasakan dengan air, di mana air sebagai media penghantar panas.	Thermometer	Nominal
Validasi metode	Metode penilaian terhadap parameter linieritas, akurasi, presisi serta LOD dan LOQ.	Spektrofotometer UV-Vis	Nominal

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah tanpa perebusan, perebusan 5 menit dan 15 menit.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar nitrit (NO_2^-) dan validasi metode.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada ini adalah panjang gelombang maksimum 543,5 nm, *operating time* 8 menit dan suhu perebusan 90°C .

F. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi seperangkat alat kaca, *hotplate* Maspion S-302, thermometer, kertas saring $0,45\ \mu\text{m}$, kertas saring Whatman, mortar & stemper, botol coklat, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit, spatula, timbangan analitik OHAUS dan Excellent serta spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-1900i.

2. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi kubis putih, asam asetat 30% (Merck), asam sulfanilat (Merck), *N-1-naftiletilediamonium* (NED) (Merck), natrium nitrit (Na_2NO_2) (Merck) dan aquadest.

G. Prosedur Penelitian

Penelitian ini memiliki langkah-langkah prosedur penelitian sebagai berikut:

1. Pembuatan Larutan Pereaksi Griess

Pembuatan larutan pereaksi Griess berdasarkan Emawati *et al.*, (2019) adalah dengan menyiapkan dua buah larutan. Larutan I dibuat dengan

menimbang 0,5 gram asam sulfanilat dan dilarutkan dalam 150 mL asam asetat 30% v/v. Larutan II dibuat dengan menimbang 0,1 gram *N-1-naftiletilen-diamonium* ke dalam 100 mL aquadest hingga larut. Larutan I dan larutan II dicampurkan ke dalam wadah botol berwarna coklat, perbandingannya adalah 1:1 dengan volume akhir 100 mL

2. Pembuatan Larutan Baku Nitrit

Pembuatan larutan baku nitrit berdasarkan Anggresani *et al.*, (2018) yaitu sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan Induk Nitrit 1000 ppm

Natrium nitrit (NaNO_2) ditimbang sebanyak 100 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Tambahkan aquadest secukupnya, lalu dikocok perlahan hingga NaNO_2 larut dan tambahkan aquadest hingga garis tanda.

b. Larutan Standar Nitrit 100 ppm

Larutan standar nitrit 100 ppm dibuat dengan memipet 10 mL larutan nitrit 1000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan aquadest hingga garis tanda dan kocok hingga homogen.

c. Larutan Standar Nitrit 10 ppm

Larutan standar nitrit 10 ppm dibuat dengan memipet 10 mL larutan nitrit 100 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan aquadest hingga garis tanda dan kocok dengan homogen.

d. Pembuatan Larutan Seri Standar Nitrit

Larutan seri standar nitrit dibuat dengan menyiapkan 6 buah labu ukur 10 mL yang kering dan bersih. Larutan standar 10 ppm kemudian dipipet ke dalam 6 tabung reaksi dengan banyak masing-masing sebanyak 1,0; 1,4; 1,8; 2,2; 2,6; 3,0 mL lalu diencerkan dengan aquadest hingga garis tanda dan kocok hingga homogen, sehingga diperoleh seri konsentrasi 1,0;1,4; 1,8; 2,2; 2,6 dan 3,0 ppm.

e. Preparasi Sampel

1) Sampel tanpa perebusan

Kubis putih dibersihkan dan kemudian dirajang sebesar $\pm 1,5$ cm. Kubis putih yang telah dirajang kemudian ditimbang sebanyak 25 gram dan dihaluskan bersama 100 mL aquadest. Kubis putih yang telah dihaluskan lalu disaring dengan Milipore sebanyak 2 kali. Pertama menggunakan kertas saring $0,45 \mu\text{m}$ dan yang kedua menggunakan kertas whatman. Penyaringan dengan alat milipore sebanyak 2 kali guna membuat larutan menjadi lebih jernih agar bisa diukur pada alat spektrofotometer. Filtrat lalu diukur kadar nitritnya. Pengukuran kadar nitrit menurut Anggresani *et al.*, (2018) adalah dengan memipet 5 mL hasil preparasi dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas dan ditambahkan 2 mL pereaksi griess. Sampel kemudian dibiarkan selama *operating time*. Sampel lalu dimasukkan ke dalam kuvet dan dilakukan pembacaan absorbansi pada λ maksimal.

2) Sampel 5 menit (t_5)

Kubis putih dibersihkan dan kemudian dirajang sebesar $\pm 1,5$ cm. Kubis putih yang telah dirajang kemudian ditimbang sebanyak 25 gram dan direbus dengan 100 mL aquadest dengan suhu 90°C selama 5 menit. Kubis putih yang telah direbus kemudian ditiriskan dan dihaluskan bersama 100 mL aquadest. Kubis putih yang telah dihaluskan lalu disaring dengan Milipore sebanyak 2 kali. Pertama menggunakan kertas saring $0,45\ \mu\text{m}$ dan yang kedua menggunakan kertas whatman. Penyaringan dengan alat milipore sebanyak 2 kali guna membuat larutan menjadi lebih jernih agar bisa diukur pada alat spektrofotometer. Filtrat lalu diukur kadar nitritnya. Pengukuran kadar nitrit menurut Anggresani *et al.*, (2018) adalah dengan memipet 5 mL hasil preparasi dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas dan ditambahkan 2 mL pereaksi griess. Sampel kemudian dibiarkan selama *operating time*. Sampel lalu dimasukkan ke dalam kuvet dan dilakukan pembacaan absorbansi pada λ maksimal.

3) Sampel 15 menit (t_{15})

Kubis putih dibersihkan dan kemudian dirajang sebesar $\pm 1,5$ cm. Kubis putih yang telah dirajang kemudian ditimbang sebanyak 25 gram dan direbus dengan 100 mL aquadest dengan suhu 90°C selama 5 menit. Kubis putih yang telah direbus kemudian ditiriskan dan dihaluskan bersama 100 mL aquadest. Kubis putih yang telah

dihaluskan lalu disaring dengan Milipore sebanyak 2 kali. Pertama menggunakan kertas saring 0,45 μm dan yang kedua menggunakan kertas whatman. Penyaringan dengan alat milipore sebanyak 2 kali guna membuat larutan menjadi lebih jernih agar bisa diukur pada alat spektrofotometer. Filtrat lalu diukur kadar nitritnya. Pengukuran kadar nitrit menurut Anggresani *et al.*, (2018) adalah dengan memipet 5 mL hasil preparasi dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas dan ditambahkan 2 mL pereaksi griess. Sampel kemudian dibiarkan selama *operating time*. Sampel lalu dimasukkan ke dalam kuvet dan dilakukan pembacaan absorbansi pada λ maksimal.

f. Analisis Nitrit dalam Sampel Kubis

1) Panjang λ maksimum

Prosedur penentuan panjang gelombang maksimum menurut Lukas *et al.*, (2016) adalah dengan memipet larutan baku nitrit 1 ppm sebanyak 10 mL lalu ditambahkan pereaksi Griess sebanyak 2 mL. Larutan kemudian dibaca absorbansinya pada λ 400-800 nm dan kemudian panjang gelombang maksimum didapatkan.

2) *Operating time*

Prosedur penentuan *operating time* menurut Lukas *et al.*, (2016) adalah dengan memipet larutan baku nitrit 1 ppm sebanyak 10 mL lalu ditambahkan pereaksi Griess sebanyak 2 mL. Larutan kemudian dibaca

absorbansinya pada λ maksimum selama 0-30 menit dan kemudian tentukan *operating time*-nya.

3. Validasi Metode

a. Linieritas

Kurva kalibrasi diperoleh dengan memplot konsentrasi 1,0;1,4; 1,8; 2,2; 2,6 dan 3,0 ppm larutan baku nitrit terhadap absorbansi rata-rata hasil pengukuran dari setiap konsentrasi. Menurut Romsiah & Meidalena, (2017), berdasarkan persamaan garis yang diperoleh, selanjutnya ditentukan derajat linieritas melalui penentuan koefisien korelasi dan koefisien variasi regresi. Hasil kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$y = bx + a.$$

Keterangan : y = Absorbansi sampel

a = Konstanta/intersep

x = Konsentrasi sampel

b = Kemiringan/slop

b. LOD & LOQ

Menurut Riyanto, (2014), pengukuran *Limit of detection* (LOD) atau batas deteksi dan *Limit of quantitation* (LOQ) atau batas kuantitasi dihitung dari persamaan regresi linear dari nilai slope dan simpangan baku (SD). Rumus dari LOD dan LOQ adalah:

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

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

Keterangan:

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

Slope : Arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap analisis blanko (a pada persamaan garis $y = bx+a$)

c. Akurasi

Penentuan akurasi digunakan metode adisi, dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan 3 konsentrasi berbeda pada sampel dan selanjutnya dianalisis (Emawati *et al.*, 2021). Metode adisi adalah menganalisis sampel, menambahkan sejumlah analit yang diperiksa (*pure analit/standar*) ke dalam sampel, mencampurnya, dan kemudian menganalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya (hasil yang diharapkan). Pada metode penambahan baku, pengukuran blanko tidak diperlukan lagi. Penentuan akurasi dilakukan dengan menghitung persentase *recovery* (Lukas *et al.*, 2016),. *Recovery* dinyatakan sebagai perbandingan antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Riyanto, 2014). Perbandingan antara sampel dan baku standar adalah 7:3 (Yunita *et al.*, 2019).

Hasil % *recovery* yang memenuhi syarat adalah 80-120% (Rohmah *et al.*, 2021). Hasil akurasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan : CA = Konsentrasi sampel sebenarnya

CF = Konsentrasi total sampel hasil pengukuran

C*A = Konsentrasi analit yang ditambahkan

d. Presisi

Presisi dinyatakan dalam koefisien variansi (KV) atau *Relative Standard Deviation* (RSD) yang dapat diperoleh dari pengukuran. Pengukuran respon dilakukan sebanyak enam kali (Romsiah & Meidalena, 2017). Presisi ditentukan sebagai simpangan baku (SD) dan % RSD (Nasution *et al.*, 2020). Kriteria akurat ditentukan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variansi (CV) 2% atau kurang (Riyanto, 2014). Rumus perhitungan SD menurut (Riyanto, 2014) adalah sebagai berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi-x)^2}{n-1}}$$

Keterangan : SD = Standar Deviasi

Xi = Konsentrasi sampel

X = Rata-rata absorbansi sampel

N = Jumlah sampel

Rumus perhitungan %RSD menurut (Riyanto, 2014) adalah sebagai berikut:

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

Keterangan : X = Kadar rata-rata sampel

SD = Standar Deviasi

$RSD = \text{Relative Standard Deviation}$

H. Analisis Data

Data-data yang didapatkan dari absorbansi sampel yang dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear. Pada uji linearitas ditentukan dengan melakukan pengukuran absorbansi. Hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh dibuat persamaan garis (regresi linear), dianalisa dan ditentukan koefisien relasinya dengan rumus:

$$Y = a + bX$$

Keterangan: Y = Serapan

X = Konsentrasi

a = konstanta / intersep

b = kemiringan / slope

Hasil penelitian yang diperoleh meliputi perhitungan kadar nitrit yang diolah dengan software Microsoft excel. Data disajikan dalam bentuk tabel maupun grafik untuk mempermudah analisis dan penentuan kesimpulan. Data juga disajikan dalam bentuk statistik untuk mempermudah pengambilan hasil dari pengaruh lama perebusan kubis putih. Analisis statika dilakukan menggunakan metode analisis varians (ANOVA) satu arah ($\alpha=0,005$) dengan program SPSS. Jika didapatkan F hasil perhitungan lebih besar dari pada F tabel dengan $\alpha=0,005$ maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan signifikan pada kadar nitrit.