

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium dalam uji pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kadar nitrit dalam kubis putih (*Brassica oleracea var. capitata*) dengan metode griess spektrofotometri. Validasi metode yang digunakan adalah linearitas, presisi, akurasi, LOD dan LOQ.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Instrumen Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo. Waktu penelitian dilakukan pada tanggal 03 Juli – 20 juli 2023.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah Tanaman kubis putih (*Brassica oleracea var. capitata*) yang diperoleh dari pasar Bandarjo, Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah bagian daun dari tanaman kubis putih (*Brassica oleracea var. capitata*). Jumlah sampel yang digunakan adalah 2 buah kubis putih dengan metode yaitu *simple random sampling* (acak sederhana), yang berarti pengambilan sampel pada kubis putih dilakukan secara acak tanpa memperhatikan tempat penjualannya. Berikut kriteria inklusi dan eksklusi yang digunakan :

a. Kriteria Inklusi

- Kubis yang dijual di pasar Bandarjo, Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah
- Kubis berbentuk bulat, besar, segar dan baru dipanen

b. Kriteria Ekslusi

- Kubis yang rusak, busuk dan tidak segar
- Kubis yang tidak dijual di pasar Bandarjo, Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah

D. Definisi Operasional

Definisi operasional adalah definisi berdasarkan karakter yang diamati dari suatu yang di definisikan tersebut.

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur
1	Suhu	salah satu faktor lingkungan yang terpenting yang memengaruhi pertumbuhan organisme. Suhu yang digunakan adalah suhu ruangan (25°C-27°C) dan suhu pendingin (8°C-10°C)	Menggunakan Thermometer ruangan dan Thermometer kulkas	Ordinal
2	Lama penyimpanan	waktu yang digunakan suatu produk untuk mempertahankan kualitasnya. Waktu yang digunakan adalah 1, 2 dan 3 hari	Menggunakan hari	Rasio
3	Nitrit	Ion-ion anorganik alami, yang merupakan bagian dari siklus nitrogen	Spektrofotometer visibel	Nominal

E. Variabel Penelitian

1. Variabel *Independent* (Bebas)

Variabel *independent* pada penelitian ini ialah Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kadar nitrit dalam kubis putih (*Brassica oleracea var. capitata*).

2. Variabel *Dependent* (Terikat)

Variabel *dependent* dari penelitian ini ialah kadar nitrit.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah suhu, panjang gelombang maksimum dan *operating time*.

F. Pengumpulan Data

1. Pengambilan Sampel

Sampel kubis putih (*Brassica oleracea var. capitata*) diperoleh dari pasar Bandarjo, Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan yaitu bagian daun dari kubis putih.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Neraca analitik, labu takar 100mL, pipet ukur 10mL, pipet tetes, pipet volume, beaker gelas 500mL, gelas ukur 25mL, labu ukur 50 mL, labu ukur 100 mL, labu ukur 250mL, labu ukur 500mL, batang pengaduk, corong, kertas saring *Whatman* No 1, buret, mortir, stemper, thermometer, lemari pendingin, alat spektrofotometer visibel (Shimadzu UV-1800).

b. Bahan

Kubis putih, natrium nitrit, asam sulfanilat, asam asetat 30%, aquadest dan *N-(1-naphthyl) ethylenediamine* (NED).

G. Prosedur Penelitian

1. Perlakuan sampel

- a. Sampel pertama yang tidak mengalami perlakuan, digunakan sebagai pembanding

Sampel sebanyak 5 g ditimbang dan dihaluskan, dimasukkan dalam labu takar 50 mL. Sampel selanjutnya ditambah dengan 50 ml aqua bidestilata yang telah dipanaskan pada suhu 80°C lalu diaduk dengan pengaduk kaca sampai homogen, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman No 1. Sebanyak 2,5 mL larutan hasil penyaringan dipipet lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, diencerkan dengan aqua bidestilata sampai tanda batas dan ditambah 2 mL pereaksi Griess.

- b. Sampel kedua yaitu pada suhu ruang 25°C–27°C yang disimpan pada hari ke-1, 2 dan 3

Sampel sebanyak 5 g ditimbang secara triplo dan dihaluskan, dimasukkan dalam labu takar 50 mL. Sampel selanjutnya ditambah dengan 50 ml aqua bidestilata yang telah dipanaskan pada suhu 80°C lalu diaduk dengan pengaduk kaca sampai homogen, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman No 1. Sebanyak 2,5 mL larutan hasil penyaringan dipipet lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, diencerkan dengan aqua bidestilata sampai tanda batas dan ditambah 2 mL pereaksi Griess.

- c. Sampel ketiga yaitu pada suhu dingin 8°C–10°C yang disimpan pada hari ke-1, 2 dan 3

Sampel sebanyak 5 g ditimbang secara triplo dan dihaluskan, dimasukkan dalam labu takar 50 mL. Sampel selanjutnya ditambah dengan 50 ml aqua bidestilata yang telah dipanaskan pada suhu 80°C lalu diaduk dengan pengaduk kaca sampai homogen, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman No 1. Sebanyak 2,5 mL larutan hasil penyaringan dipipet lalu dimasukkan ke dalam labu

takar 10 mL, diencerkan dengan aqua bidestilata sampai tanda batas dan ditambah 2 mL pereaksi Griess.

2. Analisis kuantitatif

a. Pembuatan Pereaksi Griess

Pereaksi Griess terdiri dari dua larutan berbeda. Larutan I dengan melarutkan 0,5 gram asam sulfanilat dalam asam asetat 30% v/v sebanyak 150 mL dan larutan II dengan melarutkan 0,1 gram N-1-naftietilen-diamonium dalam aquadest 100 mL hingga larut (Emawati *et al.*, 2021).

b. Pembuatan Larutan Baku Nitrit

Natrium nitrit ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dalam aqua bidestilata sampai volumenya tepat 100 mL hingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari konsentrasi 1000 pm diambil 10 mL dilarutkan dalam 100 mL aqua bidestilata hingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Dari konsentrasi 100 ppm diambil 1 mL dilarutkan dalam 10 ml aqua bidestilata hingga diperoleh konsentrasi 10 ppm (Lestari *et al.*, 2011).

c. Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku natrium nitrit konsentrasi 1,0 ppm, diambil 10 mL dan ditambah 2 mL pereaksi Griess kemudian dibaca absorbansinya pada λ 400-800 nm. Diperoleh panjang gelombang yang memberikan absorbansi maksimum (Lestari *et al.*, 2011).

d. Penentuan *Operating Time*

Larutan baku natrium nitrit konsentrasi 1,0 ppm, diambil 10 ml dimasukkan dalam enam labu takar dan masing-masing ditambah 2 ml pereaksi Griess kemudian dibaca absorbansinya pada λ max pada menit 0-30 menit. Ditentukan *operating timenya* (Lestari *et al.*, 2011).

e. Pembuatan kurva baku natrium nitrit

Larutan baku natrium nitrit dengan konsentrasi 1,0; 1,4; 1,8; 2,2; 2,6 dan 3,0 ppm, masing-masing diambil 10 mL dan ditambahkan 2 mL pereaksi Griess. Larutan dibiarkan selama *operating time* selama 9-13 menit kemudian dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer Visibel pada panjang gelombang maksimum yang didapat yaitu 544,50 nm (Lestari *et al.*, 2011).

3. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah proses pembuktian atau konfirmasi pengujian yang objektif di Laboratorium, dan bahwa metode itu memenuhi persyaratan yang telah ditentukan, yang sesuai dengan tujuan penggunaannya (Ibrahim, 2007).

a. Linearitas (*linearity*)

Linearitas dibuat dengan membuat suatu seri konsentrasi larutan baku natrium nitrit yaitu: 1,0; 1,4; 1,8; 2,2; 2,6 dan 3,0 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan diukur absorbansinya. Dari kurva hubungan antara konsentrasi natrium nitrit dengan absorbansi, diperoleh nilai koefisien korelasi. Dengan nilai koefisien korelasi tersebut dapat ditentukan linearitasnya baik atau tidak (Lestari *et al.*, 2011).

b. Ketelitian (*precision*)

Larutan baku natrium nitrit dengan konsentrasi 1,0 pm, diambil 10 mL, dimasukkan dalam enam tabung reaksi dan masing masing ditambah 2 ml pereaksi Griess. Larutan dibiarkan selama *operating time* yaitu 9-13 menit dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yaitu 544,50 nm. Kemudian dihitung nilai SD dan RSD (Lestari *et al.*, 2011).

c. Ketepatan (*accuracy*)

Dalam penelitian ini dilakukan akurasi dengan menggunakan metode penambahan baku (*standard addition methode*). Ketepatan dilakukan dengan menghitung *persentase recovery*. Sampel sebanyak 5 g ditimbang secara triplo dan dihaluskan, dimasukkan dalam labu takar 50 mL. Salah satu ditambahkan larutan baku natrium nitrit konsentrasi 100 ppm sebanyak 1 ml sedangkan lainnya tidak. Sampel selanjutnya ditambah dengan 50 ml aqua bidestilata yang telah dipanaskan pada suhu 80°C lalu diaduk dengan pengaduk kaca sampai homogen, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman No 1. Sebanyak 2,5 mL larutan hasil penyaringan dipipet lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, diencerkan dengan aqua bidestilata sampai batas tanda dan ditambah 2 mL pereaksi Griess. Larutan dibiarkan selama *operating time* yang stabil pada menit ke 9-13 dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 544,50 nm. *Recovery* dihitung dengan membandingkan kadar nitrit terukur terhadap kadar nitrit sebenarnya (Lestari *et al.*, 2011).

H. Analisis Data

1. Analisis Kuantitatif

Penelitian dilakukan dengan menganalisis kadar nitrit secara kuantitatif dalam kubis putih yang diperoleh di pasar Bandarjo, Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Instrumen Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo pada bulan Juni 2023. Analisis nitrit dilakukan dengan Metode Griess, dengan pengukuran secara Spektrofotometri Visibel dengan rumus : $y = bx + a$.

Keterangan :

- y = absorbansi sampel
- a = konstanta/intersep
- b = kemiringan/slope
- x = konsentrasi sampel

2. Linearitas (*linearity*)

Dari kurva hubungan antara konsentrasi natrium nitrit dengan absorbansi, diperoleh nilai koefisien korelasi. Pada linearitas diperoleh nilai persamaan kurva baku yaitu $y = 0,2456x - 0,0125$ dengan nilai $r = 0,9959$.

3. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi (*Limit of detection*) dan batas kuantitasi (*Limit of quantitation*) dapat dihitung secara statistika melalui persamaan garis linear dari kurva baku. Nilai pengukuran akan sama dengan pada persamaan garis linear $y = bx + a$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). Menurut Lestari *et al.*, (2011) :

Batas deteksi.

$$\mathbf{LOD} = \frac{3Sy/x}{\mathbf{Slope}}$$

Batas kuantitasi :

$$\mathbf{LOQ} = \frac{10Sy/x}{\mathbf{Slope}}$$

Keterangan :

Sy/x : Simpangan baku

$Slope$: Arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap analisis blanko

4. Ketelitian (*precision*)

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

Keterangan :

SD = Standar deviasi

X_i = Konsentrasi sampel

\bar{X} = Rata-rata absorbansi sampel

N = Jumlah sampel

$$\text{RSD} = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

Keterangan :

X = Kadar rata-rata sampel

SD = Standar deviasi

RSD = *Relative standard Deviation*

5. Ketepatan (*accuracy*)

$$\text{Recovery} = \frac{\text{Kadar terukur}}{\text{kadar sebenarnya}} \times 100\%$$

6. SPSS

Data yang diperoleh dalam penelitian ini kemudian dikelompokkan berdasarkan uji kadar nitrit dalam bentuk tabel dan narasi. Analisis data dilakukan secara statistik menggunakan SPSS secara One Way Anova dengan tingkat kepercayaan 95% dan tingkat kesalahan 5%.