

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental di Laboratorium Instrumen Farmasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa ikan asin yang terdapat di pasar Kota Salatiga. Analisis pada penelitian ini terdiri dari analisis kualitatif dan analisis kuantitatif dengan menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis, untuk mengetahui kadar formalin yang terkandung dalam sampel ikan asin.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental pada bulan Juli 2023 di Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.

C. Populasi dan Sampel

Penelitian ini dengan populasi sampel ikan asin menggunakan 5 sampel yang telah diambil dari pasar raya II di Kota Salatiga menggunakan teknik *accidental sampling*.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu 5 sampel ikan asin yang dijual di pasar Salatiga.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu kandungan formalin dalam ikan asin dan validasi metode.

1. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu panjang gelombang, kurva kalibrasi dan *operating time*.

E. Kriteria Sampel

1. Kriteria inklusi

Adapun kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu berwarna coklat dengan bercak keputihan, tekstur keras, tidak mudah membusuk, tidak dikerubungi lalat, dan tidak berbau khas ikan asin (Nugrahaeni, et., al. 2013)

2. Kriteria eksklusi

Adapun kriteria eksklusi pada penelitian ini yaitu ikan segar.

F. Definisi Operasional

Definisi operasional mencakup batasan-batasan yang digunakan untuk memperoleh data serta memudahkan dalam menganalisis hasil penelitian, pembahasan, dan kesimpulan.

1. Ikan asin adalah ikan asin yang dijual di pasar Kota Salatiga.
2. Formalin yang terdeteksi ditemukan dalam ikan asin.
3. Uji kualitatif adalah dengan menentukan panjang gelombang maksimum.
4. Uji kuantitatif adalah dengan metode Spektrofotometri UV-Vis, untuk menentukan kadar formalin yang terdapat didalam sampel.

G. Instrumen Penelitian

1. Alat

Spektrofotometer UV-vis, timbangan analitik, beaker glass, kaca arloji, tabung reaksi, spatula besi, pipet tetes, pipet volume 1 ml, ball pailus, labu ukur, gelas ukur, batang penjepit, corong penyaring, rak tabung, waterbath, kertas saring, sarung tangan dan masker.

2. Bahan

Formaldehde 37%, asam kromatofat, asam sulfat 60%, aquadest, dan sampel ikan asin.

H. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan di pasar di Kota Salatiga yaitu pasar blauran dengan pedagang yang berbeda menggunakan teknik *accidental sampling*. Sampel yang diambil berdasarkan ciri-ciri ikan asin yang memiliki kandungan formalin, kemudian dibawa ke Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

2. Preparasi Sampel

Tahap pengujian sampel terlebih dahulu yaitu persiapan sampel yang akan digunakan, kemudian dilakukan uji secara kualitatif. Diambil sebanyak 10 gram ikan asin dari masing-masing sampel yang telah dihaluskan, kemudian tambahkan 100 mL aquadest sedikit demi sedikit lalu larutan disaring dan di ambil filtratnya (Intan Lestari *et al.*,2021)

- a. Pembuatan Kontrol positif

1 ekor ikan asin direndam menggunakan larutan formalin, lalu keringkan.

b. Pembuatan Kontrol negatif

1 ekor ikan segar yang telah dibersihkan kemudian direndam menggunakan garam selama 24 jam lalu dikeringkan dengan cara dijemur.

3. Analisis kualitatif pada λ_{maks}

Dilakukan uji sampel A, B, C, D, dan E dengan panjang gelombang 574,70 nm yang telah di ketahui λ_{mask} formalin.

4. Analisis Kuantitatif Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

a. Pembuatan Pereaksi Asam Kromofat 0,5%

Ditimbang sebanyak 0,5 gram asam kromatofat, lalu larutkan ke dalam asam sulfat 60% lalu encerkan sampai tanda batas labu ukur 100 ml (Lestari *et all.*, 2022)

b. Pembuatan Larutan Induk Formalin 1000 mg/L

Timbang Formaldehid 37% sebanyak 0,27 mL, kemudian masukkan kedalam gelas kimia 100 mL lalu ditambahkan aqudest hingga tanda batas. Aduk hingga homogen lalu masukkan kedalam botol berwarna gelap.

c. Uji Menggunakan Asam Kromatofat 0,5%

Masukkan 2 mL filtrat sampel dan 5 mL asam kromatofat 0,5% kedalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan selama 15 menit dengan

suhu 100°C. Ikan mengandung formalin larutan akan berubah warna menjadi merah keunguan (*Iskandar,2017*).

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil larutan standar formalin 10 ppm sebanyak 2 ml dan 5 ml reaksi asam kromatofat, lalu panaskan pada suhu 100°C dalam waktu 15 menit, kemudian tentukan panjang gelombang maksimum dan nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan rentang 400-600 nm.

e. Penentuan Operating Time

Diambil sebanyak 2 ml larutan baku formalin 10 ppm dan 5 ml pereaksi asam kromatofat, lalu masukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, setelah itu dinginkan lalu ukur absorbansinya pada panjang maksimum yang telah didapat sebelumnya. Pengukuran optimasi waktu dilakukan selama 60 menit.

f. Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan standar Formalin

Larutan standar 100 ppm yang telah dibuat, kemudian diambil sebanyak 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, dan 1 ml, untuk membuat 5 konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm, dengan menambahkan air suling sampai tanda batas gelas ukur 10 ml. kemudian ambil 2 ml dari masing-masing konsentrasi, lalu ditambahkan 5 ml pereaksi asam kromatofat, kemudian aduk hingga homogen dan panaskan selama 15 menit pada suhu 100°C. Lalu amati perubahan

warna yang terjadi. Masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

g. Penetapan Kadar Formalin (*Manopo dkk,2014*)

Diambil 2 ml filtrat pada masing-masing sampel, lalu masukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml pereaksi asam kromatofat pada masing-masing sampel. Lalu dipanaskan selama 15 menit dengan suhu 100°C. Kemudian dinginkan, lalu masukkan kedalam kuvet, dan diukur menggunakan spektrofotomer UV-Vis pada Panjang gelombang maksimum.

Kadar formalin pada sampel dapat di hitung menggunakan persamaan Regresi $y = bx + a$, dimana :

$$y = bx + a$$

keterangan :

y = Absorbansi

x = Konsentrasi

b = Koefisien regresi (menyatakan *slope* = kemiringan)

a = Tetapan regresi (menyatakan *intersep*)

h. Validasi Metode

a. Linieritas

Metode yang digunakan yaitu spike placebo dengan membuat 5 larutan standar formalin dengan konsentrasi yang berbeda yaitu, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm, lalu tambahkan 2 ml pereaksi asam kromatofat 0,5% dalam asam sulfat 60%, lalu diukur

dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Hasil nilai absorbansi yang telah didapatkan dibuat kurva baku kemudian dihitung menggunakan rumus :

$$y = bx + a$$

keterangan :

y = Absorbansi

x = Konsentrasi

b = Koefisien regresi (menyatakan *slope* = kemiringan)

a = Tetapan regresi (menyatakan *intersep*)

Nilai persyaratan atas linieritas dapat dievaluasi dari nilai koefisien korelasi (r) $\geq 0,999$ (Yuwono & Indrayanto, 2005).

b. LOD dan LOQ

Persamaan garis regresi diperoleh dari konsentrasi larutan terhadap respon detector. Slope dari persamaan garis regresi digunakan untuk menghitung nilai LOD dan LOQ. Nilai simpangan baku diperoleh dari hasil simpangan baku residual respon detector. Nilai Lod atau batas deteksi diperoleh dengan dihitung menggunakan rumus :

$$\text{LOD} = 3 \frac{\frac{SDy}{x}}{Sl}$$

Keterangan :

LOD = *limit of detection*

SDy/X = simpangan baku residual

Sl = slope

Sedangkan nilai batas kuantitasi diperoleh dari perhitungan dengan

rumus :

$$LOQ = 10 \frac{SDy}{Sl}$$

Keterangan :

LOQ = *limit of quantitation*

SDy/x = simpangan baku residual

Sl = slope

c. Akurasi

Perolehan kembali pada larutan matrik dihitung dengan membagi kadar yang diperoleh dengan kadar teoritis dikali 100% sedangkan perolehan kembali pada sampel didapatkan dengan rumus :

$$\%Recovery = \frac{cf-cu}{ca} \times 100\%$$

Keterangan :

Cf = Konsentrasi analit dengan penambahan larutan standar

Cu = Konsentrasi analit tanpa penambahan larutan standar

Ca = Konsentrasi analit standar yang ditambahkan

Larutan sampel tanpa penambahan (cu) terlebih dahulu ditentukan kadarnya. Syarat akurasi dinilai dari persen perolehan kembali yang bernilai 95 – 102% (AOAC,2013).

d. Presisi

Presisi ditentukan dengan cara *repeatability* yaitu diukur menggunakan spike placebo dari konsentrasi pada akurasi, dengan dilakukan 6 kali pengulangan. Kemudian ditambahkan reagen asam

kromatofat lalu diukur menggunakan spektrofotometer UV -Vis.

Setelah itu tentukan nilai RSD dengan syarat nilai presisi dari RSD

< 2 % (AOAC, 2013) dengan menggunakan rumus :

$$RSD = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

Keterangan :

RSD = standar deviasi relatif

SD = standar deviasi

X = rata – rata kadar

I. Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini dengan menguji dan menganalisis hasil kadar formalin pada ikan asin, dengan metode spektrofotometer UV-Vis. Hasil data yang diperoleh dapat disajikan dalam bentuk table, kurva, dan analisa.

J. Pengolahan Data

Hasil data yang diperoleh menggunakan spektrofotometri kemudian dipaparkan hasilnya berdasarkan analisa kurva kalibrasi dengan persamaan

Regresi $y = bx + a$, dimana :

$$y = bx + a$$

keterangan :

y = Absorbansi

x = Konsentrasi

b = Koefisien regresi (menyatakan *slope* = kemiringan)

a = Tetapan regresi (menyatakan *intersep*)