

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan adalah eksperimen kuantitatif di laboratorium kimia analitik, karena peneliti ingin mengetahui nilai potensial yang optimal dengan parameter pH, suhu, dan lama perendaman membran menggunakan elektroda selektif ion.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah jajanan berupa kerupuk yang dijual di pasar Dinoyo, pasar Blimbing, pasar Besar dan pasar Sawojajar.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian adalah jajanan berupa kerupuk yang secara visual terindikasi menggunakan pewarna sintesis berwarna merah. Jumlah atau ukuran sampel yang digunakan akan diambil secara acak dari semua pedagang.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti terbagi menjadi dua, yaitu *dependent variable* (variabel tergantung) dan *independent variable* (variabel bebas). *Independent variable* dalam penelitian ini adalah kandungan rhodamin B dalam jajanan yang dijual di pasar Dinoyo, pasar Blimbing, pasar Besar dan pasar Sawojajar, sedangkan *dependent*

variable-nya adalah nilai potensial rhodamin B yang diukur menggunakan elektroda selektif ion berbasis kitosan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian akan dilaksanakan selama 2 bulan dari bulan maret sampai Juni 2013.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Peralatan yang akan digunakan adalah neraca, peralatan gelas, botol semprot, botol sampel, oven, potensiometer, pH meter, magnetic stirer, dan blender elektrik. Sedangkan bahan yang digunakan adalah Rhodamin B, asam asetat 3% v/v, NaOH, aquades, PVC, DOP, DBP. Aliquat 336 Cl, dan pelarut THF.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Rhodamin B

Rhodamin B merupakan bahan pewarna yang penggunaannya dilarang pemerintah, namun masih sering ditemukan pada makanan, terutama makanan jajanan. Rhodamin B adalah zat pewarna berupa serbuk kristal berwarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, sangat larut dalam air yang akan menghasilkan warna merah kebiru-biruan dan berfluorensi kuat.

4.6.2 Membran kitosan

Kitosan merupakan produk biologis yang bersifat kationik, nontoksik, *biodegradable* dan biokompatibel. Kandungan gugus amino (NH_2) pada kitosan lebih banyak dari kitin sehingga menjadi lebih nukleofilik dan memiliki sifat basa.

4.6.3 Elektroda Selektif Ion

Elektroda selektif ion merupakan suatu sensor elektrokimia yang peka terhadap aktivitas ion larutan yang diukur ditandai dengan perubahan potensial secara *reversible*. Elektroda selektif ion memiliki sifat selektif, yaitu dapat menentukan satu jenis ion dalam campuran ion-ion lain dan bersifat sensitif karena sangat peka (batas deteksinya sangat kecil)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Preparasi larutan

4.7.1.1 Pembuatan larutan induk Rhodamin B Na 0,5 M

Larutan induk rhodamin B Na 0,5 M dibuat dengan cara mereaksikan larutan NaOH dengan larutan HCOOH hasil oksidasi sesuai reaksi :



Padatan NaOH dengan BM 40 g/mol ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dilarutkan dengan aquades secara kuantitatif hingga mencapai volume 100 ml. Larutan NaOH dibuat dengan konsentrasi 0,5 M sebanyak 100 ml. Larutan COOH juga dibuat dengan konsentrasi 0,5 M. COOH dengan BM 479 g/mol dibuat sebanyak 23,95 gram, lalu dilarutkan hingga volume 100 ml. Kedua larutan NaOH dan COOH dicampurkan sehingga menghasilkan larutan induk rhodamin B Na 0,5 M.

4.7.1.2 Pembuatan larutan baku Rhodamin B Na

Pembuatan larutan standar Rhodamin B Na dapat dilihat pada Tabel 4.1. Larutan rhodamin B Na dengan konsentrasi masing-masing yang telah diambil,

lalu dipindahkan ke labu takar yang sesuai secara kuantitatif dan diencerkan hingga tanda batas.

Tabel 4.1 Pembuatan Larutan Baku Rhodamin B Na

Labu	Konsentrasi Rhodamin B Na yang diambil (M)	Volume Rhodamin B Na yang diambil (ml)	Konsentrasi Rhodamin B Na yang dihasilkan (M)
50,0 ml	0,5	10,0	10^{-1}
50,0 ml	10^{-1}	5,0	10^{-2}
50,0 ml	10^{-2}	5,0	10^{-3}
50,0 ml	10^{-3}	5,0	10^{-4}
50,0 ml	10^{-4}	5,0	10^{-5}
50,0 ml	10^{-5}	5,0	10^{-6}
50,0 ml	10^{-6}	5,0	10^{-7}
50,0 ml	10^{-7}	5,0	10^{-8}

4.7.1.3 Pembuatan ESI rhodamin B tipe kawat terlapis

4.7.1.3.1 Preparasi Kitosan

Preparasi kitosan dilakukan dengan melarutkan 1 gram kitosan serbuk dengan menggunakan asam asetat dengan konsentrasi 3% (v/v) sebanyak 100 ml.

4.7.1.3.2 Pembuatan badan elektroda

Badan elektroda ESI rhodamin B dibuat dari kawat platina dengan panjang 5 cm dan diameter 0,5 mm. Panjang salah satu ujungnya 1,5 cm dibiarkan terbuka sedangkan ujung lainnya ditutup dengan plastik polietilen (PE) yang memiliki sifat inert. Ujung sebelah atas kawat disambung dengan kabel

koaksial RG-58 yang kemudian terhubung ke alat potensiometer. Ujung kawat yang terbuka dibersihkan dengan cara dicuci menggunakan asam nitrat 36% (b/b), lalu dibilas dengan aquades dan etanol 96% (b/b) sebanyak tiga kali, lalu dikeringkan.

4.7.1.4 Pembuatan dan optimasi membran

Optimasi membran dilakukan dengan cara membuat membran sebanyak 1 gram pada berbagai komposisi perbandingan PVC : Kitosan: DOP/DBP: Aliquat 336 Cl yang bervariasi seperti yang ditunjukkan pada tabel 4.2 dibawah ini:

Tabel 4.2 Perbandingan Komposisi Membran

Komposisi Membran	Komposisi Bahan (%)				
	PVC	Kitosan	DOP	DBP	Aliquat 336 Cl
1	3	39	58	0	0
2	4	34	61,5	0	0,5
3	4	34	0	61,5	0,5
4	4	37	59	0	0
5	4	40	56	0	0
6	5	38	57	0	0
7	6	39	55	0	0

Hal yang pertama dilakukan adalah mencampurkan kitosan dengan DOP, lalu ditambah dengan THF sebanyak 3 ml, kemudian ditambahkan PVC sedikit demi sedikit diaduk selama 3 jam. Diamati pengaruh aktivasi kitosan terhadap kerja ESI pada konsentrasi 1×10^{-1} - 1×10^{-8} dan dibuat perbandingan terhadap harga *Nernst* yang diperoleh.

4.7.2 Pembuatan larutan buffer fosfat

Larutan buffer fosfat dibuat pada rentang pH 4 sampai 7. Larutan buffer fosfat dibuat dengan penambahan NaOH 0,1 M ke dalam H_3PO_4 0,1 M 50 ml sambil diukur pH-nya menggunakan pH meter. Volume NaOH yang ditambahkan bervariasi sesuai dengan pH yang akan diuji.

4.7.3 Karakterisasi dasar ESI

4.7.3.1 Faktor *Nernst* dan kisaran konsentrasi

Penentuan faktor *Nernst* dilakukan dengan cara mengukur potensial yang dihasilkan oleh ESI rhodamin B dengan berbagai konsentrasi larutan uji dari 1×10^{-1} sampai 1×10^{-8} dengan tiga kali pengulangan. Elektroda pembanding yang digunakan adalah elektroda Hg/HgCl. Potensial dicatat ketika alat menunjukkan potensial yang konstan. Data yang diperoleh dibuat grafik hubungan E_{sel} (mV) terhadap $-\log(\text{COO}^-)$. Kurva yang diperoleh merupakan garis lurus pada kisaran konsentrasi tertentu dengan kemiringan sebesar $-2,303 \text{ RT/nF}$ (faktor *Nernst*). Kisaran konsentrasi linier ditunjukkan oleh garis lurus pada kurva hubungan E (mV) terhadap $-\log(\text{COO}^-)$

4.7.3.2 Batas deteksi

Batas deteksi diperoleh dengan cara membuat garis singgung pada fungsi garis lurus dan membuat garis melengkung kurva antara E_{sel} (mV) terhadap $-\log(\text{COO}^-)$. Perpotongan kedua garis singgung tadi diekstrapolarisasikan terhadap sumbu x sehingga dapat diketahui konsentrasi batas deteksi dari ESI rhodamin B yang dibuat.

4.7.3.3 Waktu respon

Waktu respon diperlukan untuk mengetahui waktu yang diperlukan oleh ESI rhodamin B dalam mengukur aktivitas atau konsentrasi analit, sehingga diperoleh harga potensial yang konstan. Penentuan waktu respon dilakukan dengan pengukuran potensial larutan rhodamin B Na dari konsentrasi 1×10^{-1} sampai 1×10^{-8} . Pengukuran dilakukan tiap konsentrasi dengan selang waktu 10-180 detik, lalu dibuat kurva hubungan antara t (waktu, sumbu x) dan p (potensial, sumbu y). Waktu respon ditunjukkan oleh harga potensial yang didapatkan pertama kali konstan. Semakin cepat waktu yang diperlukan untuk merespon analit, maka kualitas ESI yang dihasilkan semakin baik.

4.7.4 Aplikasi ESI pada sampel

4.7.4.1 Pengaruh pH

Semakin jauh nilai pengukuran dari nilai faktor *Nernst* teoritis ($59,2 \pm 5$ mV/dekade konsentrasi), maka menunjukkan bahwa larutan tidak diperbolehkan diukur pada nilai pH tersebut.

4.7.4.2 Pengaruh suhu

Semakin jauh nilai pengukuran dari nilai faktor *Nernst* teoritis, maka menunjukkan bahwa larutan tidak diperbolehkan diukur pada suhu tersebut.

4.7.4.3. Pengaruh ion asing Cl^- dan asetat

. Kedua ion asing Cl^- dan asetat merupakan senyawa lain yang biasanya terkandung di dalam makanan atau jajanan seperti kerupuk, tahu, kue, mie, dan lain-lain. Pengukuran dilakukan untuk membandingkan harga faktor *Nernst* antara larutan standar rhodamin B dengan larutan rhodamin B ditambah ion asing.

4.8 Ekstraksi rhodamin B pada sampel menggunakan test kit rhodamin B

Diambil satu sendok teh serbuk kerupuk yang telah dihaluskan. Kemudian ditambahkan air panas sebanyak dua sendok makan (10 ml) lalu diaduk agar rhodamin B yang ada pada makanan tertarik ke fase air. Setelah itu dibiarkan dingin selama beberapa menit.

Test kit rhodamin B terdiri dari reagen A dan B. Reagen A ditambahkan sebanyak empat tetes ke dalam sampel, lalu dikocok dengan kencang sampai tercampur. Warna merah pada larutan akan berkurang atau menurun intensitas warnanya. Kemudian ditambahkan empat tetes reagen B, lalu dikocok kembali sampai warnanya bercampur. Apabila warna merah kembali muncul atau intensitas warnanya menguat berarti sampel yang diuji positif mengandung rhodamin B.

4.9 Analisis Data

Akurasi merupakan kedekatan hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya dari suatu jumlah yang diukur. Akurasi ditentukan dengan menghitung % kesalahan relatif dari suatu perlakuan percobaan (Miller, 1991) :

$$\% \text{ Kesalahan relatif} = \frac{|\bar{X} - x_i|}{\bar{X}} \times 100\%$$

Harga % kesalahan relatif yang semakin kecil menunjukkan semakin tinggi tingkat ketelitian hasil pengukuran sehingga akurasi dapat ditentukan sebagai berikut :

$$\text{Akurasi} = 100\% - \% \text{kesalahan relatif}$$

Ketelitian hasil pengukuran dapat ditentukan dengan menghitung standar deviasi (s) dan *Coefficient of Variation* (CV) dari suatu perlakuan (Skoog, 1996):

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\text{Presisi} = 100\% - CV$$