

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan adalah eksperimen kuantitatif untuk mengetahui nilai optimal dari parameter karakterisasi ESI yaitu: Faktor Nernst, Limit deteksi, Rentang Konsentrasi, Usia Pemakaian, Waktu Respon.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan adalah krupuk yang dijual di pasar Dinoyo karena pasar ini adalah salah satu tempat jual-beli makanan di Malang.

##### 4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah kerupuk yang secara visual terindikasi menggunakan pewarna merah. Sampel akan diambil secara acak dari pedagang kerupuk di Pasar Dinoyo, Pasar Blimbing, Pasar Besar dan Pasar Sawojajar.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti terbagi menjadi variabel bebas dan terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kandungan Rhodamin B yang terdapat dalam kerupuk. Variabel terikatnya adalah potensial Rhodamin B yang diukur dalam ESI.

#### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian ini sudah dilakukan mulai bulan Februari 2013

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat-alat

- a. Kawat Platina
- b. Potensiometer
- c. pH meter
- d. Neraca
- e. Peralatan gelas
- f. Botol Semprot
- g. Kabel
- h. Pengaduk magnetik
- i. Oven
- j. Blender elektrik
- k. *Testkit* rhodamin B Easy Test (ET Group)



#### 4.5.2 Bahan-bahan

- a. Rhodamin B p.a (Merck)
- b. Pelarut THF
- c. Kitosan bubuk
- d. Asam asetat glasial p.a
- e. NaOH p.a
- f. Polimer PVC (Sigma)
- g. DOP (Sigma)
- h. DBP (Sigma)
- i. Kawat platina
- j. Asam asetat 3% (b/v)
- k. HNO<sub>3</sub> 65% (b/v)
- l. Etanol 96% (b/v)

#### 4.6 Prosedur Kerja

##### 4.6.1 Preparasi Larutan

##### 4.6.1.1 Pembuatan Larutan Induk Rhodamin B 0,5 M

Larutan induk dibuat dengan mereaksikan larutan NaOH dengan larutan rhodamin B. Larutan NaOH 100ml dibuat dengan konsentrasi 0,5 M. Caranya dengan padatan NaOH (BM 40) ditimbang sebanyak 2 g dan dilarutkan secara hingga mencapai volum 100 ml dengan akuades. Larutan rhodamin B juga dibuat dengan konsentrasi 0,5 M. Rhodamin B (BM 479) ditimbang

sebanyak 23,95 g dan dilarutkan dengan akudes hingga mencapai volum 100 ml. Kedua larutan tersebut kemudian dicampurkan sehingga menghasilkan larutan rhodamin B 0,5 M.

#### 4.6.1.2 Pembuatan Larutan Standart rhodamin B

Sejumlah larutan rhodamin B diambil dan diencerkan hingga tanda batas pada labu ukur 50 ml. Larutan standar dapat dibuat dengan mengikuti tabel di bawah ini:

Labu Ukur yang digunakan (ml)	Konsentrasi rhodamin B yang akan diambil (M)	Volume rhodamin B yang diambil (ml)	Konsentrasi rhodamin B yang akan didapat (M)
50	0,5	10,0	$10^{-1}$
50	$10^{-1}$	5,0	$10^{-2}$
50	$10^{-2}$	5,0	$10^{-3}$
50	$10^{-3}$	5,0	$10^{-4}$
50	$10^{-4}$	5,0	$10^{-5}$
50	$10^{-5}$	5,0	$10^{-6}$
50	$10^{-6}$	5,0	$10^{-7}$
50	$10^{-7}$	5,0	$10^{-8}$

**Tabel 4.2 Pembuatan Larutan Baku Rhodamin B**

#### 4.6.2 Pembuatan ESI

##### 4.6.2.1 Pembuatan ESI

Kawat Pt yang akan berfungsi sebagai badan elektroda, dipotong menjadi ukuran 5 cm, sisakan ujungnya sepanjang 1,5 cm sementara sisanya ditutup dengan badan pena. Ujung atas dari kawat disambungkan dengan kabel koaksial RG-58 yang terhubung ke potensiometer. Selanjutnya ujung kawat bawah yang terbuka dicuci dengan asam nitrat 65% (b/v) dan dibilas dengan akudes dan etanol 96% (b/v) dengan 3 kali pembilasan dan dikeringkan. Fungsi dari perlakuan tersebut untuk membersihkan kawat dari lemak dan kotoran yang menempel.

##### 4.6.2.2 Pelarutan Kitosan

Kitosan yang akan digunakan dalam pembuatan membran, dilarutkan lebih dahulu dengan ditambah dengan asam asetat 3% (b/v) dengan perbandingan kitosan : asam asetat 3% dengan perbandingan 1 : 10 dan diaduk selama 24 jam.

##### 4.6.2.3 Pembuatan dan Optimasi Komposisi Membran

Bahan-bahan membran yang terdiri dari kitosan yang sudah dilarutkan, PVC, DOP dicampurkan ke dalam pelarut THF. Cara pencampurannya adalah kitosan dengan DOP dicampurkan, kemudian ditambahkan pelarut THF sebanyak 3 ml. PVC kemudian ditambahkan

sedikit-demi sedikit dan diaduk selama 3 jam. Masing-masing komposisi membran dibuat dengan berat total campuran 1 g. Optimasi komposisi membran dilakukan dengan cara mengubah-ngubah jumlah komposisi membran seperti tabel di bawah:

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

**Tabel 4.3 Perbandingan Komposisi Bahan Membran**

#### 4.6.2.4 Pengkonstruksian ESI Kawat Terlapis

Kawat Pt dicelupkan ke dalam larutan membran yang telah dibuat sampai ada larutan membran yang menempel dan melapisi kawat Pt. Kawat yang terlapis tersebut kemudian dikeringkan pada suhu kamar selama 30 menit kemudian dipanaskan dalam oven bersuhu 50 °C selama

12 jam. Kawat Pt tersebut kemudian didinginkan dan direndam dalam larutan Na-Rhodamin B, dibilas dengan akuades hingga pH sekitar 5 dan dikeringkan pada suhu ruangan.

#### 4.6.3 Optimasi Waktu Perendaman

Dilakukan setelah kawat Pt didinginkan setelah dipanaskan dengan oven dan akan direndam dalam larutan rhodamin B 0,5 M. ESI yang telah dibuat direndam dengan variasi waktu 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 menit. Setelah itu, kawat-kawat Pt tersebut digunakan untuk mengukur potensial larutan uji Na-Rhodamin B pada tiap konsentrasi. Pengukurannya dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Harga potensial yang keluar dari tiap waktu perendaman yang mendekati harga Nernst teoritis ( $59,2 \pm 5$  mV/decade konsentrasi) menunjukkan waktu perendaman optimum untuk ESI.

#### 4.6.4 Karakterisasi Sifat Dasar ESI Rhodamin B Berbasis Kitosan

##### 4.6.4.1. Faktor Nernst dan Rentang Konsentrasi Pengukuran

Pengukuran faktor Nernst yang dihasilkan oleh ESI dilakukan dengan cara mengukur potensial yang dihasilkan ESI pada larutan uji dengan konsentrasi:  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  M pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Pembacaan potensial dilakukan jika alat sudah menunjukkan potensial yang konstan. Data hasil pengukuran yang telah didapat kemudian dibuat

kurva  $E_{sel}$  (mV) vs  $-\log(COO^-)$ . Kurva yang didapatkan adalah garis lurus dengan *slope*/kemiringan sebesar  $-2.303 RT/nF$  yang merupakan faktor Nernst.

#### 4.6.4.2. Batas Deteksi

Batas deteksi diperoleh dengan membuat garis singgung pada fungsi garis lurus dan garis melengkung pada kurva  $E_{sel}$  (mV) vs  $-\log(COO^-)$ . Perpotongan dari kedua garis tersebut kemudian diekstrapolasikan ke sumbu x sehingga batas deteksi dari ESI dapat diketahui.

#### 4.6.4.3. Waktu Respon

Pengukuran waktu respon bertujuan untuk mengetahui berapa waktu yang dibutuhkan oleh ESI untuk mengukur konsentrasi suatu sampel sehingga didapatkan harga potensial yang konstan dari sampel tersebut. Larutan rhodamin B konsentrasi  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  M diukur potensialnya. Tiap-tiap konsentrasi akan diukur selang waktu yang dibutuhkan sampai didapat potensialnya antara 10-180 detik. Setelah itu, dibuat kurva  $t =$  waktu vs  $p =$  potensial, waktu respon ditunjukkan oleh harga potensial konstan yang pertama kali didapatkan.

#### 4.6.4.4. Usia Pemakaian

Fungsi dari penentuan usia pemakaian ESI adalah untuk mengetahui sampai berapa lama ESI masih dapat digunakan. Caranya adalah melihat seberapa jauh penurunan performa ESI melalui faktor Nernst yang dihasilkan. Pengukuran larutan rhodamin B dengan konsentrasi  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  M. ESI dikatakan sudah melewati

usia pakainya jika penyimpangan faktor Nernst yang dihasilkan semakin jauh dari nilai teoritisnya.

#### 4.6.5 Ekstraksi Rhodamin B dalam Sampel Jajanan

Sebanyak 1 g sampel kerupuk yang telah dihaluskan menggunakan blender ditimbang menggunakan timbangan digital. Sampel tersebut kemudian disiram dengan air mendidih sebanyak 20 ml, diaduk dan disaring menggunakan kertas saring. Bagian yang digunakan untuk pengujian sampel adalah air hasil saringan tersebut.

#### 4.6.6 Pengujian Sampel Kerupuk secara Kualitatif

Sampel diambil sebanyak 10 ml dan ditetesi dengan *test kit* rhodamin B. Pertama, tabung reaksi ditetesi dengan reagen A sebanyak 1 tetes, reagen A2 3 tetes dan reagen C sebanyak 1 tetes kemudian dikocok selama 3 menit. Reagen tersebut kemudian dicampurkan dengan sampel rhodamin B dan diamati perubahan warnanya, jika cairan berubah warna menjadi keunguan menunjukkan dalam sampel positif mengandung rhodamin B.

#### 4.6.7 Pengujian Sampel Kerupuk secara Kuantitatif

Pengujian dengan ESI dilakukan dengan cara mencelupkan elektroda ke dalam larutan sampel dan potensial yang konstan dicatat. Potensial tersebut kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar dari membran sehingga akan didapatkan nilai konsentrasi dari sampel.

Pengujian dengan spektrofotometer UV-VIS dilakukan dengan membuat kurva standar terlebih dahulu dengan cara mengukur absorbansi larutan standar rhodamin B konsentrasi  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$  M sehingga akan didapatkan persamaan kurva standar. Larutan sampel kemudian diukur absorbansinya. Nilai absorbansi yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar sehingga akan didapatkan konsentrasi dari sampel.

#### 4.7 Analisa Data

Perhitungan nilai rata-rata potensial hasil pengukuran dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$$

Keterangan:

$\bar{x}$  = rata-rata nilai potensial

$x_i$  = nilai potensial ke- $i$

$i$  = pengulangan ke- $i$

$n$  = jumlah pengulangan

Selain menghitung nilai rata-rata potensial, salah satu persyaratan yang mendasar dalam suatu analisis adalah ketelitian dan ketepatan. Hasil analisis dapat dikatakan teliti (*accurate*) jika nilai rata-rata hasil pengukuran mendekati nilai sebenarnya (*true value*) dari suatu jumlah yang diukur, sedangkan hasil analisis dikatakan tepat (*precise*) jika dalam satu seri pengukuran mempunyai selisih yang sangat kecil antar satu nilai dengan nilai yang lain.

Ketepatan hasil pengukuran yang diperoleh dapat ditentukan dengan menghitung nilai SD (standar deviasi) dan CV (koefisien variasi). Perhitungan SD dan CV dapat dihitung dengan persamaan:

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

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} 100\%$$

Keterangan:

SD = standart deviasi

CV = koefisien variasi

$x_i$  = nilai faktor Nernst ke-i

$\bar{x}$  = rata-rata nilai faktor Nernst

n = jumlah pengulangan

Presisi: 100% - CV

Semakin kecil nilai SD dan CV dari seluruh hasil pengukuran, maka metode yang digunakan semakin tepat.

Ketelitian dapat diketahui dengan menghitung % kesalahan relatif.

Perhitungan % kesalahan relatif dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ kesalahan relatif} = \frac{|\bar{x} - x_i|}{\bar{x}} 100\%$$

Keterangan:

$x_i$  = harga faktor Nernst ke-i

$\bar{x}$  = nilai rata-rata harga faktor Nernst

Harga % kesalahan relatif yang semakin kecil (< 5%) menunjukkan semakin tinggi tingkat ketelitian hasil pengukuran sehingga akurasi dapat ditentukan sebagai berikut:

Akurasi = 100% - % kesalahan relatif

Data hasil pengukuran metode potensiometri dan spektrofotometri dibandingkan dengan metode uji-t menggunakan software SPSS dengan hipotesisnya sebagai berikut:

Ho: Nilai konsentrasi rhodamin B dari kedua metode sama

H1: Nilai konsentrasi rhodamin B dari kedua metode tidak sama

Interpretasi hasil Ho diterima apabila nilai sig (2 tailed) hasil perbandingan kedua metode dengan uji-t yang muncul dari SPSS lebih dari 0,05, sedangkan interpretasi H1 diterima apabila nilai sig (2 tailed) yang muncul kurang dari 0,05.