

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui nilai dari parameter karakterisasi ESI dengan komposisi aliquat-336:kitosan:PVC:DOP (perbandingan komposisi 0,5%:5%:34,5%:60% b/b) dan waktu perendaman 25 menit pada larutan metanil yellow konsentrasi 0,05 M. Parameter yang diuji yaitu: faktor Nernst, batas deteksi, rentang konsentrasi linier, waktu respon, dan usia pakai.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2014.

4.3 Alat dan Bahan

4.3.1 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah potensiometer (merk *Schott*), rangkaian kawat platina dan kabel (elektroda), elektroda pembanding kalomel (merk *Schott*), timbangan analitik, peralatan gelas, peralatan plastik (botol sampel), bola hisap, botol semprot, *magnetic stirer*, oven, dan stopwatch.

4.3.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan dengan derajat kemurnian pro analisis (p.a). Adapun bahan-bahan tersebut adalah metanil yellow (Merck), aliquat-336-Cl (Sigma), kitosan (Sigma), asam asetat glasial, pelarut THF (Sigma), asam nitrat 65% (b/v), timbal (II) nitrat, polimer PVC (Sigma), akuades, pemlastis, DOP (Sigma), etanol (96% b/v).

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Preparasi Larutan

4.4.1.1 Pembuatan Larutan Baku Induk Metanil Yellow 0,05 M

Larutan induk metanil yellow konsentrasi 0,05 M (Mr: 375,38) dibuat sebanyak 50 mL. Padatan metanil yellow ditimbang sebanyak 0,93845 gram, kemudian dilarutkan dengan akuades pada gelas beker dengan volume 20 mL dan diaduk sampai homogen. Kemudian dipindahkan secara kuantitatif dalam labu ukur 50 mL. Volume labu ukur ditepatkan hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

4.4.1.2 Pembuatan Larutan Baku Kerja Metanil Yellow

Larutan baku kerja metanil yellow dibuat konsentrasi 10^{-2} - 10^{-9} M dengan melihat Tabel 4.1. Larutan metanil yellow 10^{-2} M dibuat dari pengenceran larutan baku metanil yellow 0,05 M dengan cara mengambil 20 mL larutan metanil yellow 0,05 M kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan kemudian dikocok sampai homogen. Pengenceran konsentrasi selanjutnya dilakukan dengan cara

pengenceran yang sama dengan volume sesuai yang ditampilkan pada Tabel

4.1.

Tabel 4.1 Pembuatan Larutan Baku Kerja Metanil Yellow 10^{-2} - 10^{-9} M

Volume akhir (mL)	Konsentrasi metanil yellow yang diambil (M)	Volume metanil yellow yang diambil (mL)	Konsentrasi metanil yellow yang dihasilkan (M)
100	0,05	20	10^{-2}
50	10^{-2}	5	10^{-3}
50	10^{-3}	5	10^{-4}
50	10^{-4}	5	10^{-5}
50	10^{-5}	5	10^{-6}
50	10^{-6}	5	10^{-7}
50	10^{-7}	5	10^{-8}
50	10^{-8}	5	10^{-9}

4.4.2 Pembuatan dan Optimasi ESI Metanil Yellow Tipe Kawat Terlapis

4.4.2.1 Pembuatan Aliquat 336-Metanil Yellow

Aliquat 336-metanil yellow dibuat dari ekstraksi alikuat 336-Cl dengan larutan metanil yellow 0,05 M. Aliquat 336-Cl dipipet sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan 10 mL larutan metanil yellow 0,05 M pada corong pisah dan dikocok selama 10 menit. Setelah itu, larutan didiamkan kurang lebih 1 jam agar fasa organik dan fasa airnya terpisah sempurna. Setelah terpisah, fasa air

dikeluarkan dari corong. Ekstraksi fase organik dilakukan sampai fase air terakhir tidak mengandung ion klorida. Untuk mengetahui ada tidaknya ion klorida, ditetaskan timbal (II) nitrat. Jika fase air masih mengandung ion klorida maka akan terbentuk endapan berwarna putih atau larutan menjadi putih keruh.

4.4.2.2 Pembuatan Kitosan Cair

Pembuatan kitosan cair dilakukan dengan cara melarutkan 1 gram bubuk kitosan ke dalam 40 mL asam asetat 3% (v/v). Selanjutnya campuran tersebut diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama \pm 4 jam hingga homogen.

4.4.2.3 Pembuatan Membran ESI Metanil Yellow Berbasis Aliquat-336-

Kitosan

Membran ESI metanil yellow tipe kawat terlapis berbasis aliquat-336- kitosan dibuat dari aliquat-336-metanil yellow, kitosan cair, PVC, dan pemlastis DOP dengan rasio komposisi masing-masing 0,5%:5%:34,5%:60% b/b. Berat total campuran komposisi bahan membran tersebut sebesar 1 gram.

Proses pembuatan adalah dengan menimbang seluruh bahan sesuai rasio, kemudian semua bahan (aliquat-336 metanil yellow, kitosan, PVC, dan DOP) dimasukkan pada gelas beker, kemudian ditambah pelarut THF 3 mL, ditutup aluminium foil, dan langsung distirer selama 3 jam sampai homogen dan tidak ada gelembung pada cairan membran. Perbandingan berat komposisi membran : volume pelarut THF = 1 : 3.

4.4.2.4 Pembuatan ESI Metanil Yellow Tipe Kawat Terlapis

Badan elektroda dibuat dengan menggunakan kawat platina dengan panjang 5 cm dan diameter 0,5 mm. Salah satu ujungnya sepanjang 1,5 cm dibiarkan terbuka sedangkan bagian lainnya ditutup dengan plastik polietilen yang bersifat inert. Pada ujung atas kawat disambungkan dengan kabel koaksial RG-58 sebagai penghubung ke potensiometer. Ujung kawat yang terbuka dibersihkan dari kotoran mekanik dan lemak dengan cara dicuci menggunakan asam nitrat 65% (b/v). Proses selanjutnya dibilas dengan menggunakan akuades dan alkohol 96% (b/v) sebanyak tiga kali pengulangan. Kemudian dikeringkan dan dilanjutkan dengan melapisi ujung kawat Pt yang terbuka dengan membran yang telah dibuat seperti prosedur 4.4.2.3.

Pelapisan membran yang telah dibuat dilakukan dengan cara mencelupkan ujung kawat platina ($\pm 1,5$ cm) ke dalam larutan membran sampai larutan membran menempel dan melapisi seluruh permukaan kawat platina. Proses pencelupan tersebut dilakukan beberapa kali sehingga diperoleh membran yang tipis dan merata setebal ± 3 mm. Setelah kawat platina terlapisi membran, kawat dikeringkan pada suhu ruang (25°C) selama 30 menit dan dilanjutkan dengan pemanasan pada suhu 50°C di dalam oven selama 12 jam.

4.4.2.5 Perendaman Membran ESI Metanil Yellow Tipe Kawat Terlapis

ESI metanil yellow yang telah dibuat dengan komposisi aliquid-336 metanil yellow, kitosan cair, PVC, dan pemlastis DOP dengan rasio masing-masing 0,5:5:34,5:60 dioptimasi perendaman sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yaitu 25 menit. Perendaman dilakukan dengan mencelupkan membran ESI pada larutan baku induk metanil yellow dengan konsentrasi 0,05 M.

4.4.3 Karakterisasi Sifat Dasar ESI Metanil Yellow

Karakterisasi ESI dilakukan untuk ESI dengan komposisi yang memiliki faktor Nernst optimum mendekati teoritis 59,2 mV/ dekade konsentrasi.

4.4.3.1 Faktor Nernst dan Rentang Konsentrasi Pengukuran

Pengukuran faktor Nernst dilakukan dengan mengukur larutan uji metanil yellow yang telah dibuat sesuai prosedur 4.4.1.2. Pengukuran menggunakan potensiometer dengan ESI yang telah dibuat dan direndam 25 menit sesuai prosedur sebelumnya dan dengan elektroda pembanding kalomel. Pengukuran dilakukan dengan pembacaan beda potensial pada potensiometer saat alat menunjukkan potensial yang tetap. Larutan uji 10^{-9} - 10^{-2} M sebanyak 25 mL diuji dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Data hasil pengukuran yang telah didapat kemudian diproses menjadi grafik hubungan antara E_{sel} (mV) vs $-\log(C_{18}H_{14}N_3O_3S^-)$ (M). Grafik yang diperoleh akan memenuhi persamaan regresi linier $y = ax + b$ berupa garis lurus pada rentang konsentrasi tertentu dengan kemiringan / slope (a) senilai dengan faktor Nernst yaitu $59,2 \pm 5$ mV/dekade konsentrasi.

Sedangkan rentang konsentrasi linier akan diukur sekaligus pada pengukuran beda potensial larutan konsentrasi 10^{-9} - 10^{-2} M. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Rentang konsentrasi linier diperoleh dari linieritas kurva E (mV) terhadap $-\log(C_{18}H_{14}N_3O_3S^-)$ (M) pada rentang konsentrasi tertentu yang memiliki nilai koefisien korelasi $R^2 > 0,98$.

4.4.3.2 Batas Deteksi

Pengukuran batas deteksi (*Limit of Detection*) bertujuan untuk mengetahui berapa konsentrasi terendah dari analit yang dapat dideteksi oleh ESI metanil yellow telah dibuat. Batas deteksi ESI metanil yellow didapatkan

dengan membuat garis singgung pada fungsi garis lurus (garis pada rentang linier) dan garis melengkung pada kurva E_{sel} (mV) vs $-\log(C_{18H_{14}N_3O_3S^-})$ (M) hasil pengukuran beda potensial ESI metanil yellow yang dibuat dan telah dioptimasi seperti prosedur sebelumnya, kemudian keduanya dipotongkan. Perpotongan dari kedua garis tersebut kemudian diekstrapolasikan terhadap sumbu x. Batas deteksi ESI didapatkan melalui persamaan matematika dari garis singgung yang dibuat pada kurva. Batas deteksi ESI yang diinginkan adalah pada konsentrasi 10^{-6} - 10^{-5} M.

4.4.3.3 Waktu Respon

Pengukuran waktu respon bertujuan untuk mengetahui berapa waktu yang dibutuhkan oleh ESI metanil yellow yang telah dibuat dan dioptimasi untuk mendapatkan harga potensial yang tetap terhadap waktu. Larutan metanil yellow dengan konsentrasi 10^{-9} - 10^{-2} M disiapkan sebanyak 25 mL pada gelas beker, kemudian diukur potensialnya. Masing-masing konsentrasi diukur potensialnya pada selang waktu 10-180 detik dengan kelipatan 10 detik. Setelah itu, dibuat kurva yang menyatakan hubungan antara waktu (t) pada sumbu x vs potensial (E) pada sumbu y. Waktu respon diketahui dari waktu ketika pertama kali didapatkan harga potensial yang tetap (stabil ± 1 mV). Semakin cepat waktu respon menunjukkan bahwa ESI yang dibuat semakin baik. Waktu yang diinginkan adalah < 1 menit.

4.4.3.4 Usia Pakai

Penentuan usia pemakaian ESI metanil yellow bertujuan untuk mengetahui sampai berapa lama ESI metanil yellow dapat digunakan dari saat pertama kali ESI dibuat dan dipakai. Usia Pemakaian ESI dapat ditentukan dengan melihat seberapa jauh penurunan performa ESI melalui faktor Nernst

yang dihasilkan. Pengukuran beda potensial menggunakan larutan metanil yellow dengan konsentrasi 10^{-9} - 10^{-2} M dengan volume sebanyak 25 mL. Jika faktor Nernst ESI semakin jauh menyimpang dari nilai teoritis ($59,2 \pm 5$ mV/dekade konsentrasi) maka dikatakan sudah melewati usia pakainya. Pada penelitian usia pakai akan dievaluasi selama ± 7 hari.

4.4 Analisa Data

Perhitungan nilai rata-rata potensial hasil pengukuran dihitung dengan Persamaan 4.1 dengan \bar{x} = rata-rata nilai potensial, x_i = nilai potensial ke-i, i = pengulangan ke-i, dan n = jumlah pengulangan.

$$\bar{x} = \sum_i \frac{x_i}{n} \dots\dots\dots 4.1$$

Presisi atau ketelitian hasil pengukuran diperoleh dengan menghitung nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (KV). Perhitungan SD ditunjukkan oleh Persamaan 4.2 dan KV ditunjukkan oleh Persamaan 4.3.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \dots\dots\dots 4.2$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} 100\% \dots\dots\dots 4.3$$

Berdasarkan Persamaan 4.2 dan 4.3, SD = standart deviasi, KV = koefisien variasi, x_i = faktor Nernst ke-i, \bar{x} = rata-rata faktor Nernst, n = jumlah pengulangan. Sedangkan dari keduanya dapat ditentukan presisi yaitu dengan rumus seperti Persamaan 4.4.



Presisi: 100% - KV **4.4**

Hasil pengukuran dikatakan presisi jika nilai KV < 2%. Semakin kecil nilai SD dan KV dari seluruh hasil pengukuran, maka metode yang digunakan semakin presisi.

Akurasi atau ketepatan dapat diketahui dengan menghitung % kesalahan relatif. Harga % kesalahan relatif yang semakin kecil (< 5%) menunjukkan semakin tinggi tingkat ketepatan hasil pengukuran. Perhitungan % kesalahan relatif seperti ditunjukkan Persamaan 4.5, sedangkan akurasi ditunjukkan Persamaan 4.6 dengan x_i = faktor Nernst rata-rata pengukuran dan \bar{x} = true value faktor Nernst.

$$\% \text{ kesalahan relatif} = \frac{|\bar{x} - x_i|}{\bar{x}} 100\% \dots\dots\dots \mathbf{4.5}$$

$$\text{Akurasi} = 100\% - \% \text{ kesalahan relatif} \dots\dots\dots \mathbf{4.6}$$

