BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian ekperimental berdasarkan prinsip potensiometri dengan cara mengukur potensial larutan metanil yellow dari rentang konsentrasi 10^{-5}-10^{-2} M menggunakan ESI metanil yellow tipe kawat terlapis berbasis aliquat 336-kitosan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari - Mei 2014.

4.3 Alat dan Bahan

4.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain adalah potensiometer (model Schott), spektrofotometer UV-VIS Shimadzu 1800, elektroda pembanding kalomel Schott, pengaduk magnetik (stirer) IKA model C-Mag HS-7, batang magnetik, timbangan analitik mettle Toledo, oven, pipet volume, statif, pH meter (Schott), dan seperangkat gelas dan plastik.

4.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah metanil yellow (Merck), $PbNO_3$ 1%, HCl 1 N, etanol 96% (b/v), aliquat 366-Cl (Sigma), kitosan, PVC dengan BM tinggi 160.000 (Sigma), DOP (Sigma), THF,

akuades, 0,020 gram padatan natrium asetat ($NaCH_3COOH$) pro analis, 0,014 gram padatan garam (NaCl) pro analis, 0,036 gram padatan natrium benzoat ($C_7H_5O_2Na$) pro analis, tahu kuning

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Preparasi Larutan

4.4.1.1 Pembuatan Larutan Induk Metanil Yellow 0,05 M

Larutan induk metanil yellow konsentrasi 0,05 M (BM :375,38) dibuat sebanyak 50 mL. Padatan metanil yellow ditimbang sebanyak 0,93845 gram, kemudian dilarutkan dengan akuades secara kuantitatif dalam labu ukur 50 mL.

4.4.1.2 Pembuatan Larutan Kerja Metanil Yellow

Larutan baku metanil yellow dibuat pada konsentrasi 10^{-9}-10^{-2} M dengan melihat tabel 4.1 larutan metanil yellow 10^{-2} M dibuat dari pengenceran larutan 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. Selanjutnya, larutan metanil yellow 10^{-3} M dibuat dari pengenceran larutan metanil yellow 10^{-2} M dengan mengambil 5 mL, kemudian dipindahkan ke labu ukur 50 mL diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, begitu seterusnya sampai konsentrasi 10^{-9} M seperti ditunjukkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Pembuatan larutan kerja metanil yellow 10^{-9}-10^{-2} M

Volume total larutan (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}

4.4.1.3 Pembuatan Larutan ion asing CH_3COOH^- 10^{-3} M

Padatan $NaCH_3COOH$ ditimbang sebanyak 0,020 gram ke dalam kaca arloji. Lalu dimasukkan ke dalam gelas beaker 25 ml. Kemudian ditambahkan aquades 20 ml dan diaduk hingga larut. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 25 ml. Kemudian ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Lalu diambil 0,25 ml ke dalam gelas ukur.

4.4.1.4 Pembuatan Larutan ion asing Cl^- 10^{-3} M

Padatan NaCl ditimbang sebanyak 0,014 gram ke dalam kaca arloji. Lalu dimasukkan ke dalam gelas beaker 25 ml. Kemudian ditambahkan aquades 20 ml dan diaduk hingga larut. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 25 ml. Kemudian ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Lalu diambil 0,25 ml ke dalam gelas ukur.

4.4.1.5 Pembuatan Larutan ion asing $C_7H_5O_2^-$ 10^{-3} M

Padatan $C_7H_5O_2Na$ ditimbang sebanyak 0,036 gram ke dalam kaca arloji. Lalu dimasukkan ke dalam gelas beaker 25 ml. Kemudian ditambahkan aquades 20 ml dan diaduk hingga larut. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 25 ml. Kemudian ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Lalu diambil 0,25 ml ke dalam gelas ukur

4.4.2 Pembuatan ESI metanil yellow kawat terlapis berbasis aliquat-336-kitosan

4.4.2.1 Pembuatan aliquat 336 metanil yellow

Aliquat 336 metanil yellow dibuat dari ekstraksi larutan aliquat 336 Cl dengan larutan metanil yellow 5.10^{-2}-10^{-1} M. Larutan aliquat 336 Cl di pipet sebanyak 10 mL diukur di gelas ukur kemudian ditambahkan 10 mL larutan metanil yellow 0,05 M dengan pipet volume dan dikocok selama 10 menit dalam corong pisah. 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, diteteskan Pb-nitrat 1%. Jika masih fase air masih mengandung ion klorida maka akan terbentuk endapan putih.

4.4.2.2 Pembuatan Kitosan Cair

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

4.4.2.3 Pembuatan membran ESI metanil yellow berbasis aliquat 336-kitosan

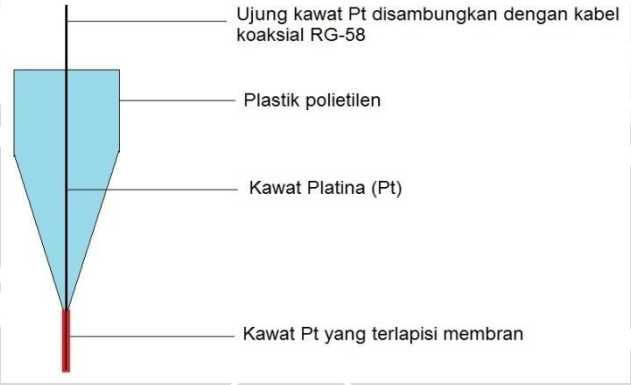
Membran ESI metanil yellow tipe kawat terlapis berbasis aliquat 336-kitosan dibuat dari aliquat 336 metanil yellow, kitosan, PVC, dan pemlastis DOP. Berat total campuran komposisi bahan membran tersebut sebesar 1 gram. Membran ESI yang digunakan dalam pengukuran dibuat dengan menggunakan 4 komposisi berbeda. Dari penelitian sebelumnya, telah didapatkan kondisi optimum yang terdiri dari aliquat 336 0.5% : kitosan 5% : PVC 34,5% : DOP 60%.

Proses awal yang dilakukan adalah mengekstraksikan aliquat 336 Cl dengan larutan baku metanil yellow sampai didapat aliquat 336 metanil yellow lalu dicampur dengan kitosan, pemlastis, kemudian ditambah pelarut THF 3 ml dengan perbandingan berat komposisi membran : volume THF = 1 : 3. Setelah itu, ditambahkan PVC sedikit demi sedikit. Selanjutnya, diaduk dengan pengaduk magnetik selama 3 jam sampai diperoleh larutan yang homogen dan tidak terdapat gelembung udara.

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 pada gambar 4.1. 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

agar kotoran sisa pencucian dengan asam nitrat 65% bisa hilang. Lalu, dikeringkan dan dilanjutkan dengan melapisi ujung kawat Pt yang terbuka dengan membran ESI.



Gambar 4.1 ESI metanil yellow kawat terlapis

4.4.2.5 Pelapisan Membran Metanil Yellow tipe kawat terlapis

Pelapisan membran dilakukan dengan mencelupkan ujung kawat platina ke dalam larutan membran sampai larutan membran menempel dan melapisi seluruh permukaan kawat platina. Proses pencelupan elektroda tersebut dilakukan beberapa kali sehingga diperoleh membran yang tipis dan merata. Elektroda yang telah terlapisi membran dikeringkan pada suhu ruang (25^{o}C) dan dipanaskan dalam oven suhu 50^{o}C selama 12 jam agar ketahanan membran meningkat. Setelah dioven, elektroda didinginkan pada suhu ruang.

4.4.3 Pengukuran Ion-ion asing dengan metode larutan tercampur

Penentuan koefisien selektivitas menggunakan metode larutan tercampur yang dilakukan dengan mengukur potensial larutan yang mengandung ion utama metanil yellow pada rentang konsentrasi linier yang telah ditentukan sebelumnya yaitu pada larutan metanil yellow 10^{-5}–10^{-2} M. Selanjutnya dilakukan pula pengukuran potensial larutan metanil yellow 10^{-5}–10^{-2} M dengan

penambahan larutan natrium asetat ($NaCH_3COOH$), garam (NaCl), natrium benzoat ($C_7H_5O_2Na$) yang masing-masing mengandung ion pengganggu ($NaCH_3COO^-$ 10^{-3} M, Cl^- 10^{-3} M dan $C_7H_5O_2^-$ 10^{-3} M) dan ditambah akuades sampai volume total 50 ml. Kemudian dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali pengulangan. Potensial yang diperoleh dari hasil pengukuran larutan yang hanya mengandung ion utama saja maupun dengan penambahan ion asing disubstitusikan dalam suatu persamaan dan dibuat kurva hubungan antara -log [metanil yellow] dengan $K_{I,j}$, jika $K_{I,j} > 1$ maka ESI metanil yellow lebih merespon secara selektif ion asing daripada ion metanil yellow sendiri, yang berarti ion asing tersebut mengganggu kinerja ESI metanil yellow.

4.4.4 Preparasi larutan sampel tahu kuning

Sampel dicuci atau dibersihkan dari pengotornya. Lalu ditimbang 1 gram sampel dan dilarutkan dalam 10 ml aquades dan dikocok dengan vortex selama 30 menit. Kemudian, larutan sampel disaring. Diambil 0,5 ml filtrat dalam tube dan tambahkan dengan aquades sampai 3 ml. Lalu ditambahkan 50 µL HCl 1 N sampai terbentuk warna merah muda (Pratim, 2013).

4.4.5 Metode Validasi ESI metanil yellow berbasis aliquat 336-kitosan

4.4.5.1 Pembuatan Kurva Baku

Dibuat larutan standar metanil yellow dengan konsentrasi (10^{-5}–10^{-2} M) yang telah ditambahkan 50 µL HCl 1 N , kemudian dilakukan pengukuran potensial sebanyak 3 kali pengulangan. Potensial yang didapatkan dari pengukuran, diekstrapolasikan pada kurva baku dengan sumbu X sebagai [- Log

konsentrasi] (M) dan sumbu Y sebagai beda potensial (mV). Lalu ditentukan linieritasnya.

4.4.5.2 Penentuan kadar Metanil Yellow dalam sampel tahu dengan metode ESI

Dilakukan pengukuran potensial terhadap sampel tahu A dan tahu B sebanyak 3 kali pengulangan. Potensial yang didapatkan dari pengukuran, diekstrapolasikan ke kurva baku yang telah dibuat sehingga dapat diketahui kadar metanil yellow yang terkandung dalam sampel tahu.

4.4.5.3 Perhitungan % Presisi dan % Akurasi

Masing-masing larutan sampel tahu A dan tahu B diukur potensialnya dengan pengulangan 3 kali. Akurasi metode dinilai berdasarkan hasil perolehan kembali, sedangkan presisinya berdasarkan koefisien variasi/simpangan baku relatif dari pengulangan perlakuan

4.4.6 Metode Validasi Spektrofotometri

4.4.6.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Dibuat larutan standar metanil yellow dengan konsentrasi 10^{-4} M yang telah ditambahkan 50 µL HCl 1 N. Lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 300-600 nm yang memiliki nilai absorbansi tertinggi sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum dan digunakan untuk pengukuran selanjutnya.

4.4.6.2 Penentuan Kurva Baku Metode Spektrofotometri

Dibuat larutan standar metanil yellow dengan konsentrasi 10^{-2} M yang telah ditambahkan 50 µL HCl 1 N, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi sebanyak 3 kali pengulangan. Absorbansi yang didapatkan dari pengukuran, diekstrapolasikan pada kurva baku dengan sumbu X sebagai [konsentrasi] (M) dan sumbu Y sebagai absorbansi. Lalu ditentukan linieritasnya.

4.4.6.3 Perhitungan akurasi dan presisi pada sampel

Masing-masing larutan sampel tahu A dan tahu B diukur absorbansinya dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Absorbansi yang didapatkan dari pengukuran, diekstrapolasikan pada kurva baku dengan sumbu X sebagai [konsentrasi] (ppm) dan sumbu Y sebagai absorbansi. Akurasi metode dinilai berdasarkan hasil perolehan kembali, sedangkan presisinya berdasarkan koefisien variasi/simpangan baku relatif dari pengulangan perlakuan.

4.4.7 Analisis Data

4.4.7.1 Perhitungan nilai rata-rata

Nilai rata-rata hasil perhitungan dari pengukuran dapat dihitung dengan persamaan 4.2 berikut

$$x = \sum_i \frac{xi}{n} \qquad (4.2)$$

Dari persamaan tersebut dapat dijelaskan bahwa x menyatakan rata-rata nilai, x_i menyatakan nilai ke-i, i menyatakan pengulangan ke-i, n menyatakan jumlah pengulangan.

4.4.5.2 Uji Presisi dan Akurasi

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel (Harmita, 2004). Presisi didapatkan dari hasil pengukuran yang diperoleh dengan menghitung nilai SD (Standar Deviasi) dan KV (Koefisien Variasi). Perhitungan SD dan KV dapat dihitung dengan persamaan 2.3 – 2.5:

$$SD = \sqrt{\frac{(xi-x)^2}{(n-1)}} \quad (2.3)$$

$$KV = \frac{SD}{x} 100\% \quad (2.4)$$

$$Presisi = 100\% - KV \quad (2.5)$$

Dapat dijelaskan bahwa SD menyatakan standart deviasi, KV menyatakan koefisien variasi, x_i menyatakan harga factor *Nerst* ke-I, x menyatakan nilai rata-rata harga factor *Nerst dan* n menyatakan jumlah pengulangan.

Hasil dikatakan presisi/ seksama jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium (Harmita, 2004).

Akurasi atau ketepatan diketahui dengan menghitung persen (%) kesalahan relatif. Harga % kesalahan relatif yang semakin kecil (<5%) menunjukkan semakin tinggi ketepatan metode hasil pengukuran. Perhitungan nilai akurasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus pada persamaan 2.6-2.7.

$$\% \text{ kesalahan relatif} = \frac{|x - x_i|}{x} 100\% \quad (2.6)$$

$$\text{Akurasi} = 100\% - \% \text{ kesalahan relatif} \quad (2.7)$$

Dapat dijelaskan bahwa x_i menyatakan nilai pengukuran ke-i, x menyatakan nilai rata-rata hasil pengukuran

4.4.5.3 Uji-t

Hasil pengukuran menggunakan ESI metanil yellow dan spektofotometeri sinar tampak kemudian dibandingkan secara statistik menggunakan uji-t untuk mengetahui apakah metode potensiometri (ESI) dan metode spektrofotometri memberikan hasil yang tidak beda nyata, dilakukan uji-t (keberartian). Untuk menyatakan bahwa kedua metoda memberikan hasil yang sama atau tidak berbeda nyata, dinyatakan dengan hipotesis nol (H_0). Untuk mengetahui apakah H_0 diterima atau ditolak, maka dilakukan uji-t sesuai persamaan 2.8-2.9 berikut (Miller dan Miller, 1991):

$$s^2 = \frac{\left|(n_1 - 1){s_1}^2 + (n_2 - 1){s_2}^2\right|}{n_1 + n_2 - 2} \quad (2.8)$$

$$t = \frac{\left|\overline{x_1} - \overline{x_2}\right|}{s\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2.9)$$

Dapat dijelaskan bahwa n menyatakan jumlah pengulangan, s_1 menyatakan standar deviasi metode ke-1, s_2 menyatakan standar deviasi metode ke-2, x_1 menyatakan nilai rata-rata hasil pengukuran menggunakan metode ke-1, x_2 menyatakan nilai rata-rata hasil pengukuran menggunakan metode ke-2, H_0 menyatakan Kedua rataan yang dihasilkan oleh metode potensiometri (ESI) dan metode spektrofotometri adalah sama

Kesimpulan:

H_0 diterima jika $t_{hitung} < t_{tabel}$

H_0 ditolak jika $t_{hitung} > t_{tabel}$