

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian observasional deskriptif. Penentuan kandungan rhodamin B dari kerupuk merah mentah jenis padang dilakukan secara kualitatif menggunakan metode benang wol dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) serta metode kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biofarmakologi Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2024.

C. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kerupuk merah mentah jenis padang yang diambil di pasar Kota Yogyakarta secara *purpose sampling*. Sampel diambil dari 5 pasar tradisional Kota Yogyakarta berdasarkan tersedianya sampel, yaitu pasar Beringharjo, pasar Demangan, pasar Ngasem, pasar Lempuyangan, dan pasar Sentul, dengan masing-masing pasar sampel diambil berjumlah 2 sampel.

1. Kriteria Inklusi: kerupuk merah mentah jenis padang tidak bermerek dengan *range* harga Rp25.000 – Rp35.000/kg, dan diperoleh dari 5 pasar sekitar Kota Yogyakarta.
2. Kriteria Eksklusi: kerupuk merah mentah jenis padang dengan merek yang sama dan bukan merupakan kerupuk merah jenis padang serta melewati masa *expired date*.

D. Variabel Penelitian

Beberapa variabel yang akan digunakan pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas

Variabel bebas penelitian berupa kerupuk merah mentah jenis padang, jumlah sampel yang dianalisis dan tempat pengambilan sampel di pasar tradisional Kota Yogyakarta, yaitu pasar Beringharjo, pasar Demangan, pasar Ngasem, pasar Lempuyangan, dan pasar Sentul.

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah parameter analisis kualitatif dari metode benang wol dan kromatografi lapis tipis (KLT), serta kadar rhodamin B dari analisis kuantitatif.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini berupa 10 sampel kerupuk merah mentah jenis padang, banyaknya pelarut etanol *p.a* yang akan digunakan.

E. Definisi Operasional

1. Sampel kerupuk yang digunakan berasal dari sepuluh kerupuk tanpa merek yang dibeli di pasar dengan kriteria, yaitu kerupuk merah mentah jenis padang dengan merek dan tanpa merek, harga berkisar antara 25.000 dan 35.000 rupiah per kilogram.
2. Sampel yang diperoleh dilarutkan dalam akuades untuk uji kualitatif berupa metode benang wol serta dilarutkan dalam etanol *p.a* untuk uji kualitatif KLT dan uji kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis.
3. Kadar rhodamin B dalam sampel ditunjukkan dengan parameter nilai absorbansi pada serapan panjang gelombang maksimum rhodamin B dalam satuan persen (%).

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang dipakai pada penelitian kali ini adalah, timbangan analitik (*Ohaus*), *glassware* (*Iwaki*), mikropipet (*Eppendorf & Ohaus*), spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10*), *hot plate*, oven (*Memmert*), *chamber*, dan UV Analyzer (*Viewing Cabinet Local Uvoc-02*).

2. Bahan

Beberapa bahan yang dipakai pada penelitian kali ini adalah sampel kerupuk merah mentah berjenis kerupuk padang tanpa merek yang diperjualbelikan di pasar Kota Yogyakarta, akuades, benang wol, etanol *pro analisis* (*Emsure*), ammonia pekat (*Emsure*), n-butanol (*Emsure*), etil asetat (*Emsure*), asam asetat 10% (teknis), HCl 4N, rhodamin B (BPL), *white tip* serta kertas saring dan plat KLT F254.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Analisis Organoleptis

Sampel diperiksa secara organoleptis berupa pemeriksaan terhadap bentuk, warna, dan bau.

2. Pembuatan Reagen Asam Asetat 10%

Pembuatan asam asetat 10% menggunakan larutan asam asetat glasial dengan mengambil sebanyak 2,5 mL kemudian dituangkan ke dalam labu takar 25,0 mL dan dicampurkan dengan akuades hingga tepat pada tanda batas.

3. Preparasi Sampel

a. Benang wol

Dimulai dengan menimbang 3 g kerupuk merah mentah yang sudah dihaluskan, masing-masing dilarutkan dalam 40 mL akuades, kemudian ditambahkan 10 tetes asam asetat 10%, dimasukkan benang wol, dan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk hingga warna melekat pada wol. Jika warna merah sudah melekat pada benang wol, selanjutnya benang wol diambil dan dicuci berulang kali dengan air suling. Bila warna merah pada benang wol menghilang, maka sampel dapat dikatakan negatif rhodamin B. Namun jika benang wol tetap memberikan warna merah maka sampel positif rhodamin B (Ahsyaf *et al.*, 2023).

b. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan spektrofotometri UV-Vis

Dimulai dengan menimbang 500,0 mg kerupuk yang sudah diserbukkan dan dimasukkan ke dalam gelas *beaker*, kemudian ditambahkan 4 tetes HCl 4N, lalu ditambahkan etanol *p.a* sebanyak 5 mL, dihomogenkan dan disaring hingga jernih. Setelah didapatkan larutan jernih

dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL dan di add sampai tanda batas dengan etanol *p.a.* Larutan ini yang akan digunakan sebagai cuplikan sampel KLT dan dibaca pada spektrofotometri UV-Vis. Larutan dibaca pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Jika absorbansi tinggi maka dilakukan pengenceran (Elfasyari *et al.*, 2020).

4. Analisis Kualitatif dengan KLT

a. Pembuatan fase gerak

Fase gerak yang dipakai berupa n-butanol : etil asetat : ammonia (10:4:5) sebanyak 10 mL (Kumalasari, 2015).

b. Analisis rhodamin B dalam kerupuk merah mentah secara KLT

Proses analisis menggunakan KLT dimulai dengan penotolan sampel dan baku pembanding rhodamin B pada plat KLT yang telah diaktifkan. Plat KLT yang terkandung cuplikan di dalamnya dipindahkan ke dalam *chamber* yang sudah dijenuhi oleh fase gerak hingga cuplikan terelusi sepenuhnya. Setelah itu, plat KLT diangkat dan ditunggu hingga kering. Hasil elusi dapat diamati secara visual dan di bawah sinar UV 254 dan 366 nm. Noda yang terlihat merah jambu secara visual dan di bawah sinar UV 254 nm berwarna orange serta di bawah sinar UV 366 nm berwarna merah muda menunjukkan adanya rhodamin B. Selanjutnya, dilakukan perhitungan nilai R_f untuk masing-masing cuplikan dan standar (Kumalasari, 2015).

5. Analisis Kuantitatif dengan Spektrofotometri UV-Vis

a. Pembuatan larutan stok rhodamin B

Larutan stok rhodamin B konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100,0 mg rhodamin B dan dituangkan ke dalam labu ukur 100,0 mL, kemudian ditambahkan etanol *p.a* hingga batas atas (Taupik *et al.*, 2021).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan rentang panjang gelombang 400–800 nm menggunakan larutan stok rhodamin B konsentrasi 3 ppm.

c. Penentuan seri kurva baku

Larutan seri baku rhodamin B dibuat dari konsentrasi 1000 ppm dengan cara mengambil 10, 15, 20, 20, 30, dan 35 μL dalam 10 mL etanol *p.a.* Setelah itu akan didapatkan masing-masing seri dengan konsentrasi 1; 1,5; 2; 2,5; 3; dan 3,5 ppm kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Kumalasari, 2015).

d. Penetapan kadar rhodamin B

Hasil yang diperoleh dari proses preparasi sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Pengenceran dilakukan jika nilai absorbansinya berada di luar *range* absorbansi kurva baku. Sampel memiliki konsentrasi awal 50.000 ppm kemudian di encerkan menjadi 3000 ppm dengan cara diambil sebanyak 300 μL dan dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL, kemudian ditambahkan etanol *p.a* hingga tanda batas. Persamaan regresi linier yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar rhodamin B dalam sampel (Kumalasari, 2015).

H. Metode Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Identifikasi kandungan rhodamin B menggunakan KLT

Sampel yang positif terkandung rhodamin B di dalamnya akan terlihat noda yang berwarna merah, kemudian noda dihitung nilai R_f nya dengan persamaan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

(Enih, 2019)

2. Penetapan kadar rhodamin B menggunakan spektrofotometri UV-Vis

Kandungan rhodamin B yang ada di sampel kerupuk merah mentah dihitung dengan persamaan regresi linier. Rumus berikut yang digunakan untuk menentukan regresi linier:

$$y = bx+a$$

Keterangan :

y = absorbansi sampel

a = nilai konstanta

x = konsentrasi sampel

b = *slope*/nilai b pada persamaan (Kresnadipayana & Lestari, 2017).

3. Analisis kadar rhodamin B pada sampel kerupuk merah mentah

Data hasil penelitian selanjutnya dianalisis dengan menghubungkan konsentrasi standar dengan absorbansi standar yang selanjutnya dilakukan perhitungan regresi linear $y = bx + a$. Setelah diketahui kadar (x) dalam regresi linier, dihitung nilai penetapan kadar sesungguhnya menggunakan rumus:

$$\text{Kadar} = \frac{(C \times V \times Fp)}{m} \times 100\%$$

Keterangan:

C = Konsentrasi

V = Volume larutan sampel

Fp = Faktor pengenceran

m = massa penimbangan sampel (Lovianasari *et al.*, 2021)

4. Perhitungan nilai rata-rata (\bar{x})

Rata-rata (\bar{x}) artinya keseluruhan nilai data yang dibagi menggunakan keseluruhan banyaknya data menggunakan rumus berikut :

$$\bar{x} = (\sum x) / N$$

Keterangan :

\bar{x} = nilai rata-rata

x = nilai data $X_1 + X_2 + X_3 \dots + X_n$

N = jumlah kejadian atau jumlah frekuensi

(Kresnadipayana & Lestari, 2017)

5. *Coeffisiensi variation* (CV)

Coefficient variation atau koefisien variasi merupakan perbandingan nilai diantara standar deviasi serta rerata nilai hitung berasal perbedaan antara standar deviasi serta rata-rata nilai dari sebuah distribusi. Nilai koefisien variasi dapat diperoleh dengan menggunakan rumus berikut :

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

Keterangan :

CV = *Coefficient variation* (koefisien variasi)

SD = Standar deviasi

\bar{X} = nilai hitung rata-rata

(Kresnadipayana & Lestari, 2017).

6. Interval kepercayaan (*Limit of error*)

Interval kepercayaan yaitu salah satu parameter untuk mengukur estimasi keakuratan rerata atau proporsi sebuah sampel yang mewakili populasi sesungguhnya. LE dapat dihitung menggunakan rumus :

$$LE = t \times \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Keterangan :

LE = *limit of error*

T = nilai *tabel*

SD = standar deviasi

n = banyak sampel

(Kresnadipayana & Lestari, 2017).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA