BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Studi penelitian ini dirancang secara deskriptif dengan metode kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini diawali dengan uji organoleptik dan kualitatif untuk mendeteksi kandungan formalin pada sampel. Jika terdapat uji kuantitatif dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dilakukan pada sampel tahu putih yang positif mengandung formalin.

B. Lokasi dan Waktu

Studi ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi, dan Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, dimulai dari bulan Juni hingga bulan Juli 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Tahu putih dari 5 pedagang di Pasar Gamping pada wilayah 1 dan 10 pedagang di Pasar Sleman pada wilayah 2.

2. Sampel

Sasaran dalam penelitian ini adalah tahu putih sebanyak 100-300 gram yang memenuhi kriteria inklusi yang diperoleh dari pedagang tahu putih di Pasar Gamping dan Pasar Sleman. Kriteria inklusi dan eksklusi yang dimaksud adalah sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi:

- 1) Berwarna putih
- 2) Tidak bermerek
- 3) Berbentuk kotak

- 4) Tahu yang masih segar (tidak berlendir, tidak berjamur, air rendaman tahu berwarna bening)
- b. Kriteria eksklusi:
- 1) Tahu yang berwarna selain putih
 - 2) Tahu yang bermerek
 - 3) Berbentuk segitiga
 - 4) Mudah hancur, berjamur, atau air rendaman tahu berwarna keruh

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Tahu putih dari 5 pedagang di Pasar Gamping pada wilayah 1 dan 10 pedagang di Pasar Sleman pada wilayah 2.

2. Variabel Terkontrol

Jenis tahu putih berdasarkan kriteria inklusi dan metode analisis kuantitatif formalin (suhu dan waktu pemanasan).

3. Variabel Terikat

Perubahan warna dan *scanning* panjang gelombang formalin (uji kualitatif)

E. Definisi Operasional

1. Identifikasi kualitatif pereaksi KMnO_4 , Schiff, Fehling A, Fehling B, asam kromatofat, dan *scanning* panjang gelombang formalin digunakan untuk mendeteksi kandungan formalin dalam tahu putih.
2. Identifikasi secara kuantitatif dengan Spektrofotometri UV-Vis dilakukan untuk mendapatkan kadar formalin dari sampel tahu putih yang positif mengandung formalin secara kualitatif.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Spektrofotometer UV-Visibel (Thermo Scientific, Genesys 10s), centrifuge (Hettich, EBA 200), timbangan analitik semi mikro (Ohaus),

erlenmeyer (Iwaki), beaker glass (Iwaki), mikropipet (Ohaus) dengan volume 100-1000 μL , beaker glass (Iwaki), batang pengaduk, kuvet, labu takar (Iwaki), mortir, bunsen, rak tabung reaksi, spatula, stamper, stirel (IKA, C-MAG HS 7), dan tabung reaksi (Iwaki).

2. Bahan

Tahu putih, formalin 37% p.a (Mallinckrodt), asam kromatofat p.a (Merck), Fehling A (teknis), Fehling B (teknis), KMnO_4 p.a, pereaksi Schiff (teknis), H_2SO_4 p.a (Mallinckrodt), akuades (teknis), tabung sentrifugasi/*conical tube* 15 mL, spiritus, dan pipet tetes.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Uji organoleptik tahu

Uji organoleptik dilakukan untuk mengevaluasi kualitas tahu putih dalam hal bau, tekstur, dan warna selama 3 hari pada suhu ruang. Tahu yang tidak mengandung formalin hanya bertahan selama tiga hari dengan ciri-ciri berbau asam, bertekstur mudah hancur, dan berwarna kuning karena ditumbuhi jamur. Tahu yang mengandung formalin akan menunjukkan ciri-ciri berbau kimia, bertekstur kenyal, berwarna putih dan tidak berjamur pada suhu kamar selama lebih dari tiga hari (Fadhilah *et al.*, 2022).

2. Uji kualitatif kandungan formalin

a. Persiapan sampel

Tahu putih ditimbang sebanyak 2 g kemudian dihaluskan dengan mortir lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 15 mL dan dimasukkan 10 mL akuades. Tabung dimasukkan dalam centrifuge dan alat sentrifugasi diputar selama 5 menit pada kecepatan 3000 rpm. Supernatan diambil dengan mikropipet secara hati-hati agar endapan tidak ikut terambil. Replikasi perolehan supernatan dilakukan 2 kali untuk masing-masing sampel. Supernatan tersebut digunakan untuk uji kualitatif (Sari *et al.*, 2021).

b. Uji kualitatif kandungan formalin dengan pereaksi warna

1) Uji pereaksi KMnO_4

Sebanyak 1 mL supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes pereaksi KMnO_4 0,1N. Diamati perubahan warna pada sampel uji. Warna yang berubah dari ungu menjadi coklat menunjukkan bahwa sampel positif (+) mengandung formalin sedangkan, jika sampel uji berwarna ungu maka sampel negatif (-) tidak mengandung formalin. Replikasi dilakukan sebanyak 2x kemudian dibandingkan dengan kontrol positif (formalin p.a) dan kontrol negatif (akuades) (Sari *et al.*, 2021).

2) Uji pereaksi Schiff

Sebanyak 1 mL supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes pereaksi Schiff. Diamati perubahan warna pada sampel uji. Warna yang berubah dari bening menjadi ungu menunjukkan bahwa sampel positif (+) mengandung formalin sedangkan, jika sampel uji berwarna bening maka sampel negatif (-) tidak mengandung formalin. Replikasi dilakukan sebanyak 2x kemudian dibandingkan dengan kontrol positif (formalin p.a) dan kontrol negatif (akuades) (Rifai & Maliza, 2021).

3) Uji pereaksi Fehling A dan B

Fehling A dan B dibuat dengan mengambil sebanyak 7,5 mL Fehling A dan 7,5 mL Fehling B dimasukkan ke dalam *conical tube* dan digojok hingga homogen. Sebanyak 1 mL supernatan ditambahkan 3 tetes campuran Fehling A dan B dalam tabung reaksi. Setelah itu, tabung reaksi yang berisi supernatan dan pereaksi Fehling A dan B dipanaskan pada api bunsen hingga muncul perubahan yang terjadi. Diamati perubahan warna dan endapan pada sampel uji. Perubahan warna dari bening menjadi orange dan adanya endapan merah bata menunjukkan bahwa sampel positif (+) mengandung formalin. Sedangkan, jika sampel uji berwarna biru dan tidak terbentuk endapan maka sampel tidak mengandung formalin. Replikasi dilakukan sebanyak 2x

kemudian dibandingkan dengan kontrol positif (formalin p.a) dan kontrol negatif (akuades) (Sammulia *et al.*, 2020).

4) Uji pereaksi asam kromatofat

Sebanyak 0,4 mL supernatan ditambahkan dengan asam kromatofat 0,5% b/v sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi kemudian larutan digojog hingga homogen. Setelah itu, campuran dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 20 menit. Diamati perubahan warna pada sampel uji. Warna yang berubah dari bening menjadi ungu menunjukkan bahwa sampel positif (+) mengandung formalin. Replikasi dilakukan sebanyak 2x kemudian dibandingkan dengan kontrol positif (formalin p.a) dan kontrol negatif (akuades) (Male *et al.*, 2017).

c. Uji kualitatif dengan *scanning* panjang gelombang formalin

1) Panjang gelombang maksimum

Sebanyak 0,4 mL larutan standar formalin dengan konsentrasi 10 ppm diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 1 mL pereaksi asam kromatofat 0,5% b/v. Campuran kemudian diaduk dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 20 menit hingga terjadi perubahan warna dari bening menjadi ungu. Setelah pemanasan, campuran tersebut dipindahkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan akuades hingga mencapai tanda batas. Akuades digunakan sebagai blanko. Absorbansi campuran tersebut diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 500-700 nm dengan interval 1 nm (Anindita, 2019).

2) Penentuan *operating time*

Operating time dilakukan untuk menentukan waktu dimana reaksi standar formalin dengan asam kromatofat yang paling stabil pada panjang gelombang maksimum. Larutan sampel dibuat mengikuti prosedur poin 1. Campuran diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. *Operating time* diukur selama 60 menit setiap

interval 1 menit. *Operating time* dipilih berdasarkan nilai absorbansi yang paling stabil (Anindita, 2019).

3) *Scanning* panjang gelombang formalin

Larutan sampel dibuat mengikuti prosedur poin 1. Kemudian campuran tersebut dimasukkan dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Lalu larutan didiamkan selama *operating time* pada suhu ruang. Blanko yang digunakan yaitu akuades. Kemudian absorbansi dibaca menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500-700 nm. Selanjutnya dibandingkan dengan kontrol positif (formalin p.a) terdapat puncak pada panjang gelombang 570 nm dan kontrol negatif (akuades) tidak terdapat puncak pada rentang panjang gelombang 500-700 nm (Anindita, 2019).

3. Uji kuantitatif tahu putih yang positif mengandung formalin

a. Pembuatan larutan baku formalin 100 ppm

Sebanyak 27 μL formalin 37% dituang ke dalam labu takar 100 mL dan kemudian ditambahkan akuades hingga mencapai tanda batas. (Niswah *et al.*, 2016).

b. Pembuatan asam sulfat 60 %

Sebanyak 62,5 mL asam sulfat pekat 96% dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL yang sudah diisi dengan akuades, lalu ditambahkan akuades hingga mencapai tanda batas dan diaduk. hingga homogen (Anindita, 2019).

c. Pembuatan asam kromatofat 0,5% b/v

Sebanyak 0,5 gram asam kromatofat ditimbang dan ditempatkan ke dalam labu takar 100 mL, kemudian ditambahkan H_2SO_4 60% hingga mencapai tanda batas, lalu diaduk hingga homogen (Anindita, 2019).

d. Pemilihan panjang gelombang dan *operating time*

Prosedur penentuan panjang gelombang dan *operating time* mengikuti poin C1 dan C2 pada uji kualitatif. Blanko yang digunakan yaitu akuades (Anindita, 2019).

e. Pembuatan kurva kalibrasi

Seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm dibuat dengan mengambil sebanyak 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; dan 1 mL dari larutan standar 100 ppm dalam labu takar 10 mL. Masing-masing seri konsentrasi diambil sebanyak 0,4 mL dan ditambahkan pereaksi asam kromatofat 0,5 %b/v sebanyak 1 mL. Setiap tabung reaksi dipanaskan pada suhu 100°C selama 20 menit di atas penangas air sehingga terjadi perubahan warna dari bening menjadi ungu. Kemudian campuran dimasukkan dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Campuran didiamkan selama *operating time*. Absorbansi larutan standar diukur pada panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan yaitu akuades. Untuk mendapatkan kurva regresi, hubungkan konsentrasi (x) dan absorbansi (y) sehingga didapatkan persamaan $y = bx+a$ (Anindita, 2019).

f. Penyiapan sampel tahu

Tahu putih ditimbang sebanyak 2 g kemudian dihaluskan dengan mortir lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 15 mL dan dimasukkan 10 mL akuades. Tabung dimasukkan dalam alat sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 rpm. Supernatan sebanyak 1 mL diambil dengan mikropipet secara hati-hati agar endapan tidak ikut terambil (Sari *et al.*, 2021).

g. Pengujian kadar formalin dengan Spektrofotometri UV-Vis

Larutan sampel dibuat mengikuti prosedur poin c uji kualitatif. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum setelah didiamkan selama *operating time*. Blanko yang digunakan yaitu akuades. Dilakukan replikasi pengujian sebanyak 3 kali dilakukan pada sampel tahu putih (Anindita, 2019).

H. Metode dan Analisis Data

Data kualitatif mencakup perubahan warna (positif atau negatif mengandung formalin) dan *scanning* panjang gelombang sampel tahu putih yang disajikan dalam bentuk tabel. Sedangkan, data kuantitatif berupa kadar formalin diperoleh dari Fadhilah *et al.*, (2022).

1. Memasukkan nilai absorbansi sampel sehingga diperoleh kadar formalin (ppm atau mg/mL) menggunakan persamaan regresi linier berikut:

$$y = bx + a \dots\dots\dots(1)$$

$$x = \frac{y-a}{b} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

y = absorbansi

b = *slope* atau kemiringan

x = kadar sampel (mg/L atau ppm)

a = *intersep* atau perpotongan

2. Kadar formalin pada poin 1 dimasukkan dalam persamaan 3 untuk mendapatkan kadar formalin sesungguhnya dibawah ini:

$$\text{Kadar sesungguhnya} = \frac{\text{kadar sampel (mg/l)} \times \text{volume (L)} \times \text{FP}}{\text{mg sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

Kadar sesungguhnya = kadar sampel (% b/b)

FP = faktor pengenceran

3. Hasil replikasi penentuan kadar sesungguhnya dihitung rata-rata, SD, CV (%), dan LE. Data kuantitatif akan disajikan dalam tabel dengan format rata-rata kadar sesungguhnya $\pm$ LE. Berikut persamaannya di bawah ini:

$$\bar{x} = \frac{x_1+x_2+x_3}{n} \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

$\bar{x}$ = rata-rata kadar sesungguhnya

x = data kadar sampel

n = banyak data yang direplikasi

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}} \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan:

SD = standar deviasi

x_i = data ke i

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

n = banyak data

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots(6)$$

Keterangan:

CV (%) = koefisien variasi (%)

SD = standar deviasi

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

$$LE = t. \text{tabel} \times \frac{SD}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots(7)$$

Keterangan:

LE = *Limit Error*/Batas Kesalahan

t. tabel = jenis tabel distribusi

n = jumlah sampel

SD = standar deviasi

UNIVERSITAS PERPUSTAKAAN
JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA