

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain analisis *non-eksperimental* deskriptif, yang melibatkan uji organoleptis, analisis kualitatif dan kuantitatif. Metode kualitatif digunakan uji reagen berupa KMnO_4 , Schiff, Fehling A, Fehling B, asam kromatofat serta uji *scanning* panjang gelombang maksimal. Analisis kuantitatif dilakukan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis yang dikombinasi dengan reagen asam kromatofat.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi *sampling*

Lokasi *sampling* dilakukan di pasar tradisional Wates Kabupaten Kulon Progo.

2. Lokasi penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan April-Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah obyek yang memiliki kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan. Populasi yang diambil pada penelitian ini adalah tahu putih yang berasal dari lima pedagang yang berjualan di Pasar Tradisional Wates yang terletak di Kabupaten Kulon Progo.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi. Terdapat dua kriteria yang digunakan dalam menentukan sampel penelitian, yaitu kriteria inklusi dan kriteria eksklusi. Kriteria inklusi berisikan ciri-ciri sampel yang akan diidentifikasi sedangkan kriteria eksklusi merupakan kriteria sampel yang dikecualikan. Target penelitian

ini merupakan tahu putih yang memenuhi kriteria inklusi. Sampel yang diambil pada setiap pedagang berjumlah lima tahu putih dengan ukuran sedang dan memenuhi kriteria inklusi dari pedagang tahu putih yang ada di pasar tradisional Wates Kabupaten Kulon Progo. Berikut merupakan kriteria inklusi dan eksklusi sampel :

a. Kriteria inklusi

- 1) Tahu yang berwarna putih
- 2) Tahu yang berbentuk persegi
- 3) Tahu yang masih dalam kondisi baik (tidak berlendir dan tidak berjamur)
- 4) Tahu yang tidak bermerek dan belum ber-PIRT
- 5) Tahu yang disimpan pada ember atau drum

b. Kriteria eksklusi

- 1) Tahu yang berwarna selain putih (kuning, coklat)
- 2) Tahu yang berbentuk selain persegi (segitiga)
- 3) Tahu yang berlendir atau berjamur
- 4) Tahu yang bermerek dan ber-PIRT
- 5) Tahu yang disimpan dalam kemasan

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah faktor yang memberikan pengaruh yang menjadi penyebab perubahan dalam variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah tahu putih dari lima pedagang di pasar tradisional Wates Kabupaten Kulon Progo yang memenuhi kriteria inklusi.

2. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol adalah faktor atau indikator tertentu yang dikontrol agar tidak mempengaruhi variabel bebas atau variabel terikat. Variabel terkontrol pada penelitian ini meliputi waktu dan suhu pemanasan.

- a. Uji Organoleptis : waktu pengamatan selama tiga hari
- b. Uji Kualitatif : reagen dan panjang gelombang

- c. Uji kuantitatif : waktu dan suhu pemanasan pada penyiapan standar dan sampel, *operating time*, dan instrumen.

3. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang nilainya dapat ditentukan atau dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini meliputi hasil uji organoleptis, perubahan warna dan hasil *Scanning* panjang gelombang maksimal pada formalin, kadar formalin pada tahu putih.

E. Definisi Operasional

Definisi operasional memberikan penjelasan mengenai metode dan prosedur sebagai standar untuk mengukur atau mengamati variabel-variabel pada suatu penelitian.

1. Kontrol positif yang digunakan yaitu tahu putih yang direndam formalin dengan konsentrasi 40 ppm dan kontrol negatif berupa tahu putih yang tidak direndam formalin, serta blanko berupa pelarut akuades sehingga kontrol dan blanko untuk memastikan keberadaan formalin pada tahu putih.
2. Uji organoleptis untuk mengamati bau, warna dan tekstur tahu putih dilakukan pada suhu ruang selama tiga hari.
3. Uji kualitatif dianalisis dengan reagen KMnO_4 , Schiff, asam kromatofat, Fehling A dan Fehling B untuk mengetahui keberadaan formalin pada sampel tahu putih, ditandai dengan perubahan warna.
4. Uji *scanning* panjang gelombang untuk mengetahui keberadaan panjang gelombang tertentu pada sampel tahu putih.
5. Uji kuantitatif menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan reagen asam kromatofat untuk menganalisis kadar formalin diukur dalam satuan ppm.
6. Sampel *spike* merupakan sampel tahu putih (S1-S5) yang diberikan penambahan tiga standar formalin berbeda yakni 20 ppm, 40 ppm, dan 60 ppm, sedangkan sampel *non-spike* merupakan sampel tahu putih yang tidak ditambahkan (*spike*) dengan standar formalin.
7. Validasi metode untuk menganalisis formalin berdasarkan kriteria akurasi, presisi, linieritas, LOD dan LOQ.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan digunakan pada penelitian ini meliputi Spektrofotometer UV-Vis (*UV-Vis Spectrophotometer Thermo Fisher Genesys 10S*), sentrifugator (*Centifuge Hettich EBA 200*), timbangan analitik semi mikro (Ohaus PAJI0003) ketelitian 0,01 mg max penimbangan 220 gram, penangas air, bunsen, mortir, stamper, mikropipet (Ohaus) 20-200 μL dan 100-1000 μL , termometer, kuvet, *magnetic stirrer*, batang pengaduk dan alat-alat gelas lainnya.

2. Bahan

Berbagai macam bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel tahu putih, larutan formalin 37% (*p.a*, Mallincrodt), reagen asam kromatofat (*p.a*, Merck), reagen Fehling A (CuSO_4), reagen Fehling B (KOH dan natrium tartarat, teknis), H_2SO_4 P (*p.a*, Merck), KMnO_4 *p.a*, reagen Schiff (fuchsin, sodium bisulfit, HCl) (*p.a* Merck), akuades, membran milipore 0,45 μm , aluminium foil, dan *conical tube* 15 mL.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan sampel tahu putih

Pengambilan sampel tahu putih dilakukan saat pagi hari di pasar tradisional Wates Kabupaten Kulon Progo pada lima pedagang yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

2. Pembuatan tahu putih sebagai kontrol

Sebanyak 1 kg kedelai dicuci dan direndam dengan air selama 6-8 jam. Selanjutnya, dihancurkan dengan blender, direbus selama 15 menit, kemudian disaring dengan kain sifon, lalu ditambahkan asam cuka, didiamkan selama 30 menit, setelah mengendap dimasukkan dalam cetakan dibungkus kain blacu. Setelah memadat dipotong untuk kontrol positif. Pembuatan kontrol positif yaitu dengan proses perendaman tahu selama 24 jam pada larutan standar formalin 40 ppm sebanyak 25 mL, sedangkan kontrol negatif tidak dilakukan perendaman dengan larutan formalin 40 ppm.

3. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan pada masing-masing sampel tahu putih. Pengamatan dimulai dari hari ke-0 hingga hari ke tiga. Perubahan yang diamati setiap harinya berupa bau, warna, dan tekstur. Setelah hari ketiga, perubahan yang akan terjadi pada tahu putih negatif formalin yaitu akan berbau tengik, berwarna kuning, memiliki tekstur yang lunak, berlendir, dan ditumbuhi jamur, sedangkan tahu putih yang positif formalin berbau kimia menyengat, berwarna putih, tekstur yang lebih padat dan kenyal, tidak memunculkan tanda-tanda berlendir, dan ditumbuhi jamur.

4. Preparasi Reagen

a. Preparasi Reagen Kalium Permanganat (KMnO_4) 0,1 N

Kalium permanganat P ditimbang sebanyak 0,316 gram. KMnO_4 dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan volumenya dicukupkan hingga 100 mL dengan penambahan akuades. KMnO_4 dipanaskan hingga terlarut sempurna lalu didinginkan pada suhu kamar, disaring, dipindahkan ke botol amber, dan diberi label.

b. Preparasi Larutan Asam Sulfat 60% (H_2SO_4)

Larutan asam sulfat 60% diambil sebanyak 62,5 mL. Akuades ditambahkan hingga volume 100 mL di dalam labu ukur 100 mL.

c. Preparasi reagen Asam Kromatofat 0,5%

Asam kromatofat seberat 0,5 gram ditimbang, kemudian diencerkan dengan asam sulfat 60% dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas.

5. Preparasi Sampel

Masing-masing sampel tahu putih ditimbang kurang lebih 4 gram lalu dihancurkan dengan mortir dan stamper hingga halus. Dimasukan kedalam *conical tube* 15 mL, dicukupkan dengan akuades hingga tanda batas, kemudian disentrifugasi selama 5 menit dan kecepatan 3000 rpm. Filtrat diambil secara hati-hati kemudian disaring dengan membran *milipore* 0,45 μm dimasukan kedalam *conical tube* 15 mL dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -15°C hingga -18°C untuk uji kualitatif dan kuantitatif yang dilakukan sebanyak tiga kali replikasi.

6. Preparasi Standar

a. Preparasi Larutan Standar Formalin 100 ppm

Larutan standar formalin 100 ppm dibuat dengan cara diambil 27 μL larutan stok konsentrasi 37% atau 370.000 ppm. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu dicukupkan dengan akuades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

b. Preparasi Standar 60 ppm

Larutan standar formalin 100 ppm diambil sebanyak 15 mL, lalu ditambahkan akuades sebanyak 25 mL hingga tanda batas guna membuat larutan standar dengan konsentrasi 60 ppm.

7. Analisis Kualitatif dengan Uji Tabung

a. Uji Reagen KMnO_4

Sejumlah 1 mL filtrat preparasi sampel diambil kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Reagen kalium permanganat ditambahkan sebanyak 3 tetes. perubahan warna yang terjadi diamati. Warna akan berubah dari ungu menjadi coklat apabila sampel positif (+) mengandung formalin, namun jika perubahan warna tidak terjadi atau tetap berwarna ungu maka sampel tidak mengandung formalin (-). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi.

b. Uji Reagen Fehling A dan B

Sejumlah 1 mL filtrat preparasi sampel diambil kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Reagen Fehling A dan Fehling B ditambahkan sebanyak 1 mL (perbandingan 1:1 v/v) lalu dihomogenkan dalam tabung reaksi, Sampel dipanaskan diatas penangas air. Hasil positif (+) mengandung formalin apabila terbentuk perubahan warna menjadi orange dengan endapan merah bata, namun apabila sampel berwarna biru dan tidak terbentuk endapan maka sampel tidak mengandung formalin (-). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi.

c. Uji Reagen Schiff

Sejumlah 1 mL filtrat preparasi sampel diambil kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan 3 tetes reagen Schiff lalu

dicermati perubahan warna yang terjadi, hasil positif mengandung formalin apabila terjadi perubahan warna dari bening menjadi ungu, namun jika tidak terjadi perubahan warna (warna tetap bening) maka sampel tidak mengandung formalin (-). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi.

d. Uji Reagen Asam Kromatofat 0,5%

Filtrat preparasi sampel diambil sejumlah 2 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan reagen Asam Kromatofat 0,5% sebanyak 5 mL (2 : 5). Sampel dipanaskan dengan durasi selama 15 menit diatas penangas air bersuhu 100° C sambil dicermati perubahan warna yang terjadi pada sampel. Hasil positif (+) mengandung formalin apabila larutan berubah warna menjadi ungu, namun apabila tidak terjadi perubahan warna (cokelat) maka sampel tidak mengandung formalin (-). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

8. Analisis Kualitatif dengan Spektrofotometri UV-Vis

a. *Scanning* Panjang Gelombang Maksimal Standar

Larutan standar formalin diambil pada konsentrasi 60 ppm sebanyak 2 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan asam kromatofat 0,5 % sejumlah 5 mL. Larutan campuran tersebut dipanaskan selama 15 menit pada suhu 100°C. Selanjutnya, larutan campuran dipindahkan ke labu ukur 25 mL dan dicukupkan dengan akuades hingga tanda batas. Larutan campuran kemudian diukur absorbansinya dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 500-700 nm. Blanko yang digunakan adalah akuades.

b. Penentuan *Operating Time* pada Standar

Operating time atau waktu operasional bertujuan untuk menentukan waktu yang dibutuhkan agar reaksi stabil, yang ditunjukkan dengan stabilnya absorbansi (penurunan absorbansi tidak lagi terjadi). Larutan standar formalin 60 ppm diambil sebanyak 2 mL lalu ditambahkan dengan reagen asam kromatofat 5 mL. Pemanasan dilakukan diatas penangas air dengan suhu 100° C selama 15 menit. Setelah itu, sampel dimasukan pada labu ukur 25 mL dan dicukupkan dengan akuades hingga tanda batas. Absorbansi yang stabil diperoleh pada menit ke-21 hingga ke-30.

c. *Scanning* Panjang Gelombang Maksimal pada Sampel

2 mL filtrat sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 mL asam kromatofat 0,5% kemudian dipanaskan di atas penangas air dengan suhu 100°C selama 15 menit. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dicukupkan dengan akuades hingga tanda batas. Absorbansi sampel dibaca menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis dalam panjang gelombang 500-700 nm. Diamati panjang gelombang maksimal yang muncul pada sampel tahu putih.

9. Validasi Metode

a. Uji Linieritas dan Kisaran

Penentuan linieritas dan kisaran dilakukan pada lima larutan standar formalin meliputi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi standar diambil 2 mL ke dalam *conical tube*, kemudian ditambahkan 5 mL larutan asam kromatofat 0,5% dalam asam sulfat 60%. Standar tersebut dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit sehingga terjadi perubahan warna larutan menjadi ungu. Setelah dipanaskan, masing-masing standar dicukupkan dengan akuades sejumlah 25 mL, selanjutnya diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimal 580 nm. Pengujian dilakukan replikasi sebesar 3 kali. Persamaan garis regresi linier dibuat dan koefisien korelasi dihitung untuk menganalisis hasil absorbansi yang diperoleh. Kurva regresi tersebut dapat digunakan untuk setiap pengukuran konsentrasi larutan formalin. Perhitungan kurva kalibrasi dengan persamaan $y = bx + a$. Parameter linieritas memenuhi syarat apabila nilai r mendekati $r \geq 0,997$. Selanjutnya, dihitung kisaran data replikasi pada masing-masing kelima konsentrasi sehingga memenuhi syarat kisaran linier $r \geq 0,997$.

b. Uji Akurasi

Uji akurasi dibuat dengan teknik *spiking* yaitu dengan penambahan tiga konsentrasi standar mulai dari 20 ppm, 40 ppm, dan 60 ppm. Larutan konsentrasi formalin 20 ppm diambil sebanyak 2 mL dimasukkan pada tabung reaksi yang sudah berisi 2 mL filtrat sampel tahu baku pembanding

konsentrasi 40 ppm, campuran tersebut ditambahkan 5 mL larutan asam kromatofat 0,5% dalam asam sulfat 60%, lalu dipanaskan diatas penangas air selama 15 menit dengan suhu 100 °C. Tahap terakhir larutan campuran dimasukan dalam labu ukur 25 mL dan di cukupkan dengan akuades hingga tanda batas. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimal 580 nm sebanyak 9x pengulangan dengan tiga kali pengulangan pada tiap konsentrasi. Nilai *%Recovery* dapat membandingkan kadar *spiking* dikurangi kadar sampel dibagi dengan kadar standar (baku) dikali 100%. Syarat yang baik nilai *% Recovery* adalah 90-107%.

$$\%R = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{\bar{x} \text{ spike}} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

%R = *% Recovery*

\bar{x}' = kadar sampel uji yang di *Spike* (ppm)

\bar{x} = kadar sampel uji yang tidak di *Spike* (ppm)

$\bar{x} \text{ spike}$ = kadar standar yang dipilih (ppm)

(Eurachem, 2014)

c. Uji Presisi

Pengujian presisi dilakukan selama tiga hari. Pada tahap ini *intraday* dilakukan pada hari pertama. Dilakukan preparasi larutan standar konsentrasi 60 ppm, larutan tersebut diambil 2 mL kemudian ditambahkan 5 mL larutan asam kromatofat 0,5% dalam asam sulfat 60% ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada suhu 100 °C, dicukupkan dengan akuades hingga tanda batas pada labu ukur 25 mL. Pengujian dilakukan pada konsentrasi 60 ppm dengan 6x replikasi. Selanjutnya diamati absorbansinya pada panjang gelombang 580 nm . Uji presisi *interday* dilakukan pengulangan dengan cara yang sama pada hari ke-2 dan ke-3. Nilai presisi dihitung dengan rumus berikut.:

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan :

% RSD = Standar deviasi relatif (%)

SD = Standar deviasi

x = Rata-rata (Gandjar & Rohman, 2015).

d. Uji *Limit of Detection* (LOD)

Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LOD). LOD merupakan konsentrasi analit terendah yang masih dapat diidentifikasi di dalam sampel. Pada uji LOD dilakukan secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi, dimana respon instrument (y) berhubungan linier dengan konsentrasi x . Perhitungan LOD dengan rumus:

$$LOD = \frac{SD \times 3,3}{Sl} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

LOD = *Limit of detection*

SD = Standar deviasi residual

Sl = *Slope* (Gandjar & Rohman, 2015).

e. *Limit of Quantitation* (LOQ)

Batas Kuantitasi / *Limit of Quantitation* (LOQ) sebagai jumlah analit terkecil dalam sampel yang masih dapat memenuhi standar. Perhitungan LOQ dilakukan secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi, dimana respon instrumen sebagai sumbu (y) berhubungan linier dengan konsentrasi sebagai sumbu (x). Perhitungan LOQ dengan rumus:

$$LOQ = \frac{SD \times 10}{Sl} \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

LOQ = *Limit of quantitation*

SD = Standar deviasi residual

Sl = *Slope* (Gandjar & Rohman, 2015).

10. Analisis Kuantitatif dengan Spektrofotometri UV-Vis

Sampel tahu putih yang diduga mengandung formalin dianalisis dengan uji kuantitatif. Sebanyak 2 mL supernatan sampel tahu ditambahkan dengan 2 mL larutan formalin 40 ppm dan 5 mL reagen asam kromatofat 0,5%. Larutan campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 100° C selama 15 menit. Larutan campuran kemudian dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan dengan akuades hingga tanda batas. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 580 nm pada menit ke-21 hingga ke-30 dengan tiga kali replikasi. Kadar formalin dalam tahu dihitung berdasarkan selisih kadar spike dengan kadar formalin 40 ppm. Perhitungan kadar dilakukan dengan memasukan hasil absorbansi kedalam persamaan regresi linier

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Perhitungan analisis data dilakukan menggunakan *excel* dengan rumus sebagai berikut :

1. Perhitungan kadar formalin

Absorbansi sampel tahu putih yang sudah didapatkan kemudian dihitung regresi linier-nya dengan rumus :

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

keterangan :

y= absorbansi

x= konsentrasi

a= tetapan regresi

b= koefisien regresi/ slope

(Khulkhi *et al.*, 2024).

2. Perhitungan Kadar

Kadar formalin ditentukan dengan memasukan nilai absorbansi dari sampel tahu putih ke dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dengan memperhitungkan faktor pengenceran atau FP dan bobot sampel (Fatma, 2023).

$$y = bx + a \dots\dots\dots(2)$$

$$x = \frac{y-a}{b} \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan :

y = absorbansi

x = kadar sampel

a = tetapan regresi / intersep

b = slope/ kemiringan

Menurut Effendy *et al.*, (2022) perhitungan kadar formalin kemudian dilanjutkan dengan perhitungan kadar sesungguhnya dengan rumus sebagai berikut :

$$Ksf = \frac{C \times FP \times V}{W} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan :

Ksf = Kadar sampel formalin % (b/b)

C = Konsentrasi formalin dalam larutan sampel (ppm)

Fp = Faktor pengenceran sampel

V = Volume total sampel (L)

W = Berat total sampel kering (mg)

3. Perhitungan Rata-Rata

$$\bar{x} = \frac{x_1+x_2+x_3+\dots+x_n}{n} \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan :

\bar{x} = rata-rata kadar sampel tahu putih (%b/b)

x = data kadar sampel tahu putih (%b/b)

n = banyaknya data sampel yang replikasi

4. Perhitungan Standar Deviasi

$$SD = \sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2 n} \dots\dots\dots(6)$$

Keterangan :

SD = standar deviasi

xi = data ke i

\bar{x} = nilai rata-rata

n = banyak data

5. *Coefficient Variation (CV)*

Parameter *Coefficient Variation (CV)* adalah ukuran keterulangan pada data yang umumnya dinyatakan dalam persen. Parameter CV untuk senyawa kadar sekelumit berkisar antara 5-15% (Gandjar & Rohman, 2015).

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \dots\dots\dots(7)$$

Keterangan :

CV = *Coefficient Variation* atau koefisien variasi (%)

SD = Standar deviasi (%b/b)

\bar{x} = Rata-rata (%b/b)

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA