

BAB VI

PROSEDUR PERCOBAAN

4.1. Sampling

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa margarin dan mentega. Proses sampling dilakukan dengan memilih produk margarin dan mentega yang diperdagangkan yang dikemas dengan jenis kemasan plastik yang berbeda.

4.2. Pembuatan Larutan Stok

Standar dibutilftalat ditimbang sebanyak 0,1 g dan dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL kemudian ditepatkan volumenya dengan asetonitril hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 2000 ppm. Larutan Stok konsentrasi 2000 ppm kemudian diencerkan untuk dibuat menjadi larutan stok konsentrasi 1000 ppm dengan mengambil 5 mL larutan stok konsentrasi 2000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL kemudian ditepatkan volumenya dengan asetonitril hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari Larutan Stok 1000 ppm tersebut lalu diencerkan kembali untuk dibuat menjadi larutan stok konsentrasi 100 ppm dengan mengambil 1 mL larutan stok konsentrasi 1000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL kemudian ditepatkan volumenya dengan asetonitril hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm

4.3. Pembuatan Larutan Baku Dan Standar Kalibrasi

Larutan baku dibuat dengan melakukan pengenceran terhadap larutan stok konsentrasi 100 ppm. Sebanyak 1 mL larutan stok 100 ppm tersebut dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, kemudian ditepatkan volumenya dengan asetonitril menjadi larutan baku 10 ppm. Larutan standar kalibrasi kemudian dibuat dengan mengencerkan larutan baku dengan mengambil 1; 0,75; 0,5; 0,2; 0,1 dan 0,05 mL yang masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditepatkan volumenya dengan asetonitril sehingga menjadi larutan standar kalibrasi konsentrasi 1; 0,75; 0,5; 0,2; 0,1 dan 0,05 ppm.

4.4. Preparasi Sampel

4.4.1. Penyiapan awal

Sampel margarin dan mentega disiapkan dengan menimbang 50 g masing-masing sampel dan dimasukkan ke dalam beaker. Beaker ditutup menggunakan aluminium foil. Beaker disimpan dalam oven pada suhu 75° C hingga sampel mencair. Bagian yang melayang dipisahkan dan bagian minyak (lapisan cair) dituangkan ke tabung sentrifuga menggunakan corong yang dilengkapi glass wool sebagai penyaring. Kemudian tabung sentrifuga yang berisi sampel dipanaskan dalam waterbath pada suhu 60° C lalu disentrifuga pada kecepatan 2000 rpm selama 25 menit. Bagian minyak ditampung dalam vial dan disimpan dalam lemari pendingin hingga proses analisis.

4.4.2. Isolasi Analit

Isolasi analit dilakukan menggunakan kolom kromatografi dengan sorben florisil. Sebelumnya, florisil perlu dideaktivasi terlebih dahulu dengan cara tempatkan 100 g florisil dalam beaker lalu dipanaskan pada suhu 140°C selama kurang lebih 16 jam. Setelah pemanasan, pindahkan ke botol reagen, tutup rapat dan dibiarkan dingin hingga suhu kamar. Kemudian tambahkan 3 mL aquades. Campurkan dengan digoyangkan atau digulirkan selama 10 menit dan diamkan selama minimal 2 jam.

Kolom kromatografi disiapkan dengan cara basah yaitu dengan cara membasahi terlebih dahulu florisil yang akan digunakan sebagai sorben dengan heksan kemudian dituangkan ke dalam kolom, kemudian ketuk kolom agar florisil mampat dan tak ada gelembung udara. Pre elusi kolom menggunakan 40 mL heksan dengan laju elusi 2 mL/menit, sisihkan hasil elusi lalu masukan 2 mL sampel ke dalam kolom. Tambahkan 40 mL heksan dan biarkan mencuci kolom, sisihkan hasil elusi. Elusi kolom dengan 100 mL campuran dietileter:heksan (20:80, v/v) dan tampung hasil elusi. Hasil elusi diuapkan hingga tersisa residu kering lalu dilarutkan kembali dengan asetonitril.

4.5. Optimasi Fase Gerak

Optimasi fase gerak dengan metode KCKT dilakukan dengan memvariasikan komposisi dan waktu elusi fase gerak dimana tipe elusi yang digunakan yaitu tipe elusi gradien dengan komposisi fase gerak air dan asetonitril.

4.6. Uji Kesesuaian Sistem KCKT

Larutan standar dibutil ftalat yang telah disiapkan disuntikkan sebanyak 7 kali ke dalam alat KCKT. Sistem kromatografi yang digunakan adalah fase balik dengan menggunakan fase diam kolom C-18, fasa gerak campuran air-asetonitril dengan perbandingan hasil optimasi, tipe elusi gradien, laju alir 1 mL/menit, detektor Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 230 nm. Hasil rekaman kromatogram kemudian dicatat luas area uji dan waktu retensinya. Nilai luas area uji dan waktu retensi kemudian dihitung simpangan baku relatifnya. Nilai simpangan baku relatif harus kurang dari 2,0%.

4.7. Validasi Metode Analisis

4.7.1. Linieritas

Linieritas diuji dengan cara menyuntikkan larutan standar dengan konsentrasi 1; 0,75; 0,5; 0,2; 0,1 dan 0,05 ppm mulai dari konsentrasi terendah ke dalam alat KCKT. Selanjutnya dari data luas area yang diperoleh, dibuat kurva antara konsentrasi dengan luas area. Dari data-data yang diperoleh kemudian ditentukan koefisien korelasi (r) dan dihitung juga nilai koefisien variansi regresi liniernya.

4.7.2. Batas Deteksi Dan Batas Kuantisasi

Batas deteksi dan batas kuantisasi diperoleh melalui perhitungan simpangan baku residual dari kurva kalibrasi pada pengujian linieritas.

4.7.3. Penentuan Kecermatan Metode

Sampel dengan 3 konsentrasi yang berbeda 0,1; 0,2; dan 0,5 ppm dianalisis menggunakan alat KCKT dengan pengerjaan yang dilakukan secara triplo. Kemudian dihitung persen perolehan kembali (% *recovery*) dari data luas area yang diperoleh.

4.7.4. Penentuan Keseksamaan Metode

Sampel dengan konsentrasi 0,2 ppm dianalisis menggunakan alat KCKT dengan penyuntikan yang dilakukan sebanyak 6 kali. Kemudian dihitung nilai simpangan baku relatifnya (RSD) dari data luas area yang diperoleh.

4.7.5. Spesifisitas

Spesifitas metode analisis diuji dengan menyuntikkan larutan sampel dan larutan standar pada satu konsentrasi ke dalam alat KCKT. Masing-masing kromatogram yang dihasilkan kemudian dibandingkan.

4.8. Pengujian Sampel

Sampel-sampel margarin dan mentega yang telah disiapkan, dianalisis menggunakan metode yang telah divalidasi. Sampel yang telah disiapkan disuntikkan ke dalam alat KCKT kemudian data luas area analit yang diharapkan dalam sampel dikonfersikan ke dalam konsentrasi dan dihitung konsentrasi sebenarnya untuk mengetahui kadar analit yang terkandung di dalam sampel.