

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1. Pengambilan Sampel**

Untuk penelitian ini sampel diambil dari sebuah pasar di Ujung Berung. Sampel rokok terdiri dari beberapa bungkus sampel rokok berpita cukai dan tanpa pita cukai rokok.

#### **4.2. Pembuatan Larutan Uji**

##### **4.2.1. Ekstraksi**

Terdapat dua sampel yang akan dianalisis kadarnya yaitu sampel 1 dan sampel 2. Sampel 1 yang terdiri dari rokok berpita cukai sebanyak 16 batang dengan berat 13,116 g dan sampel 2 terdiri dari rokok yang tidak berpita cukai dengan berat 13,116 g. Setelah mendapatkan sampel dari rokok berpita cukai, tembakau rokok dipisahkan dari filter dan kertas pembungkus rokok, sampel masing-masing dimasukkan ke dalam gelas ukur 500 ml, setelah itu direndam dengan etanol 96% dan didiamkan selama 3 hari untuk sampel 1, demikian pula dengan sampel 2 direndam selama 3 hari. Setelah itu kedua ekstrak disaring dan ekstrak tersebut lalu di pekatkan dengan rotari evaporator pada temperatur tidak lebih dari 50 °C. Ekstrak hasil evaporasi tersebut kemudian ditempatkan dalam cawan penguap, di atas penangas sampai didapat ekstrak kental.

### **4.3. Analisis Nikotin Dalam Sampel**

#### **4.3.1. Pembuatan baku nikotin**

Untuk larutan baku (1000ppm), nikotin baku ditimbang sebanyak 25 mg, kemudian dilarutkan dalam asetonitril pro KCKT ke dalam labu ukur 25 ml. Setelah itu dibuat larutan baku dengan konsentrasi 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm dan 140 ppm.

#### **4.3.2. Pembuatan fase gerak**

Pembuatan dapar asetat 0,02 M pH 5 yaitu dengan menimbang amonium asetat ( $M_r = 77,08$ ) sebanyak 0,462 gr, kemudian dilarutkan dalam akuabidestilata sebanyak 300 ml. untuk mendapatkan pH 5 ditambahkan asam klorida.

### **4.4. Penentuan Kondisi Optimum KCKT**

Untuk memperoleh kondisi optimum untuk mengukur kadar nikotin dalam ekstrak, dilakukan percobaan dengan menyuntikan ke dalam KCKT. Kondisi optimum yang diperoleh yaitu :

Fase gerak : asetonitril : akuabidestilata dengan perbandingan (5: 95 v/v)

Kolom : C18, Zorbax (250 x 4,6 mm), ukuran partikel 5  $\mu$ m.

Detektor : UV

Deteksi uv : panjang gelombang 254 nm

Laju alir : 0,5 ml/menit

Volume injeksi : 20  $\mu$ l

#### 4.5. Kinerja Analitik

Parameter analisis yang ditentukan dalam kinerja analitik ini meliputi linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi dan limit kuantitasi. Linearitas dinyatakan dengan membuat persamaan garis lurus  $y = bx + a$ , akurasi dengan % perolehan kembali, presisi dinyatakan dengan simpangan baku, limit deteksi dan kuantitasi dinyatakan dengan rumus  $Sy/x$ .

##### 4.5.1. Linieritas

Penentuan linieritas dilakukan dengan cara membuat larutan yang mengandung nikotin dengan konsentrasi 60; 80; 100; 120; 140 ppm. Selanjutnya diukur dengan menggunakan KCKT dengan detektor UV 254 nm, yang menghasilkan luas area setiap konsentrasinya dan dibuat persamaan garis lurus  $y = bx + a$ . dimana  $a$  menyatakan perpotongan dengan sumbu x dengan sumbu y dan  $b$  menyatakan kemiringan dari larutan yang telah dibuat dari berbagai konsentrasi yang telah terukur. Linieritas kurva kalibrasi dilihat dari koefisien korelasi ( $r$ ) dengan rumus dan koefisien variansi.

##### 4.5.2. Penentuan akurasi

Penentuan akurasi dilakukan menggunakan 3 konsentrasi yaitu 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm. Kemudian dari konsentrasi 80 ppm dipipet 0,8 ml dari larutan induk lalu ditambahkan 10ml asetonitril dan ditambahkan 1 ml sampel, untuk konsentrasi 100 ppm dipipet 1 ml dari larutan induk dan ditambahkan 1 ml sampel lalu di ditambahkan asetonitril hingga 10 ml dan pembuatan 120 ppm dengan cara diambil 1,2 ml dari standar ditambahkan 1 ml sampel dan ditambahkan hingga 10

ml dengan asetonitril. Larutan ini kemudian diinjeksi masing-masing sebanyak 3 kali menggunakan KCKT untuk proses analisisnya.

#### 4.5.3. Penentuan presisi

Penentuan presisi dilakukan menggunakan larutan konsentrasi 100 ppm. Untuk konsentrasi 100 ppm dipipet 1 ml dari larutan induk dan ditambahkan 1 ml sampel lalu ditambahkan asetonitril hingga 10 ml, selanjutnya larutan tersebut diinjeksi sebanyak 6 kali. Ketelitian diukur dengan menghitung presentase relatif standar deviasi (%RSD)  $\leq 2,0\%$ .

#### 4.5.4. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blankonya, sehingga diperoleh kemiringan garis dan standar kurva standar yang diperoleh dari persamaan  $y = bx + a$ , yang diperoleh dari kurva kalibrasi. Untuk batas deteksi ditentukan dari hasil antara 3 simpangan baku residual dengan kemiringan garis kurva standar. Sedangkan batas kuantitasi ditentukan dari hasil bagi antara 10 simpangan baku residual (SBR) dengan kemiringan garis kurva standar.

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

$$LOD = 3 \times S_y/x \quad (2)$$

Untuk penentuan limit kuantitasi dapat menggunakan rumus :

$$LOQ = 10 \times S_y/x \quad (3)$$

#### 4.5.5. Uji kesesuaian sistem

Larutan standar nikotin diinjeksi 7 kali pada KCKT, kemudian dilihat luas area, waktu retensi, nilai resolusi, dan faktor ikutan dan dihitung nilai simpangan baku residual (SBR) nya. Nilai SBR yang baik harus  $\leq 2,0\%$ .

