BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pengambilan Sampel

Sampel tahu diambil dari tiga pasar tradisional di Bandung yaitu pasar T1, T2, T3. Dan tiga dari super market atau pasar modern M1, M2, M3. Dari masing tempat diambil dua sampel tahu kuning. Sampel kemudian ditampung dan disiapkan untuk pengolahan sampel selanjutnya.

4.2. Analisis Kualitatif

Ambil tahu kuning sebanyak 5 gram lalu dihaluskan dengan menggunakan mortir kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 2 mL, sehingga akan menjadi suspensi makanan. Kemudian suspensi yang telah terbentuk diaduk hingga homogen dan biarkan selama 10-15 menit, lalu disentrifugasi. Cairan diuapkan diatas penangas air dan residu ditambahkan beberapa tetes air kemudian diasamkan. Larutan sampel tahu diasamkan dengan menggunakan HCl 5% (untuk mendeteksi secara kualitatif sampel tahu akan berubah warna menjadi keunguan saat ditetesi asam HCl)

4.3. Analisis Kuantitatif

4.3.1. Preparasi sampel

Sampel tahu yang sudah dihaluskan ditimbang sebanyak 2 gram lalu dilarutkan dengan aquabidestilata hingga 5 mL ke dalam labu ukur 25 mL,

repository.unisba.ac.id

kemudian divortex selama 10 menit, lalu di tambahkan dengan metanol hingga tanda batas. Kemudian larutan dikocok hingga homogen.

4.3.2. Pengisolasian zat pewarna dengan SPE

Lakukan aktivasi (pengkondisian) kolom dengan menggunakan pelarut metanol, untuk membasahi permukaan penjerap, kemudian dilakukan (retensi) dengan memasukan larutan sampel yang sudah homogen, larutan yang sudah dilewatkan ditampung dalam tabung reaksi, lalu bilas SPE dengan menggunakan metanol untuk menghilangkan matriks lain yang tidak diinginkan yang masih terjerap di penjerap, kemudian dielusi dengan menggunakan campuran fase gerak A: 8,8 mL dan fase gerak B: 1,2 mL untuk menarik analit yang diinginkan.

4.3.3. Pembuatan fase gerak

Diamonium fosfat $(NH_4)_2HPO_4$ sebanyak 1,584 gram, dilarutkan dengan 300 mL aquabidestilata dalam beaker glass. Kemudian tambahkan NH_4OH ke dalam beaker glass hingga pH larutan 8,8 dan dikocok sampai homogen (Fase gerak A). Sehingga didapatkan larutan buffer diamonium fosfat. Fase gerak B dibuat dengan cara mencampurkan asetonitril pro HPLC dengan buffer diamonium fosfat pH 8,8, dengan perbandingan 50 : 50 (Fase gerak B). Sebelum masuk ke dalam sistem kromatografi, fase gerak disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 µm (Ayuningtyas *dkk*, 2012).

4.3.4. Pembuatan larutan standar

Larutkan 25 mg standar pewarna kuning metanil sebagai baku standar ke dalam labu ukur 25 mL dan tambahkan ke dalamnya metanol hingga tanda batas, lalu dihomogenkan (larutan induk). Dipipet 10, 20, 30, 40, 50, 60 µL larutan

repository.unisba.ac.id

induk tersebut kemudian dimasukan kedalam masing-masing 6 labu ukur 10 mL dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6 ppm dan diencerkan dengan metanol hingga tanda batas, dihomogenkan, kemudian disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 µm, lalu dimasukan kedalam *vial* yang sudah di sediakan. Selanjutnya injeksikan ke alat KCKT.

4.3.5. Analisis kuantitatif kuning metanil dengan metode KCKT

KCKT yang digunakan adalah HPLC Agilent 1220 Infinity LC dengan kondisi analisis kromatografi sebagai berikut:

a. Kolom : C18 (250 mm x 4,60 mm)

b. Fase gerak : fase gerak A : $(NH_4)_2HPO_4$ pH 8,8 : aquabidestilata

fase gerak B : $(NH_4)_2HPO_4$ pH 8,8 Berbanding asetonitril (50:50)

c. Laju alir : 0,71 mL / menit

d. Detektor UV-Vis : Panjang gelombang 419 nm

e. Volume injeksi : 40 µL

4.3.6. Penetapan kadar kuning metanil dalam tahu kuning

Sampel yang sudah di isolasi dengan menggunakan SPE dilakukan penyaringan dengan membran filter 0,45 µm. Setelah didapat larutan uji, dianalisis dengan menggunakan KCKT pada panjang gelombang 419 nm dengan menyuntikan sampel kedalam alat KCKT tersebut. Sehingga penetapan kadar untuk setiap sampel dapat dilakukan *duplo*.

repository.unisba.ac.id

4.4. Kinerja Analitik

4.4.1. Presisi

Larutan standar kuning metanil 2 ppm disuntikan kedalam KCKT sebanyak 40 µL. penyuntikan diulang sebanyak 6 kali. Kemudian hitung. Simpangan Baku Relatif (RSD) tidak lebih dari 2% pada tiap konsentrasi.

$$RSD = \frac{SD}{X} x100\%$$

Keterangan :
SD = Simpangan baku
X = Rata-rata konsentrasi total sampel yang diperoleh dari Pengukuran

4.4.2. Linieritas

Larutan induk standar kuning metanil 1000 ppm dipipet sebanyak 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL dan 60 µL dan diencerkan dengan aquabidestilata pro HPLC sehingga diperoleh larutan standar kuning metanil dengan konsentrasi masing-masing 1, 2, 3, 4, 5, 6 ppm. Masing-masing larutan disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 µm dan disuntikan secara terpisah dengan volume injeksi sebesar 40 µL ke dalam kolom KCKT. Kemudian dicatat dan dibuat kurva konsentrasi terhadap luas area (kurva kalibrasi).

4.4.3. Limit deteksi dan limit kuantitasi

LOD dan LOQ ditentukan berdasarkan persamaan linier yang diperoleh pada pembuatan kurva kalibrasi. LOD dan LOQ dihitung dari kemiringan garis dan standar deviasi kurva standar yang diperoleh, selanjutnya limit deteksi ditentukan dari hasil bagi antara 3 simpangan baku standar deviasi dengan kemiringan garis kurva standar. Sedangkan limit kuantitasi ditentukan dari hasil bagi ntara 10 standar deviasi dengan kemiringan garis kurva standar, batas deteksi

repository.unisba.ac.id

dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula (Harmita, 2004: 130-131).

$$Q = \frac{k\ x\ S_b}{Sl}$$

Keterangan :
Q = LOD (batas deteksi) / LOQ (batas kuantitasi)
K = 3 untuk batas deteksi dan 10 untuk batas kuantitasi
S_b = Simpangan baku respon analitik dari blanko
Sl = Arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis y = a+bx)

4.4.4. Akurasi

Dilakukan pembuatan standar adisi dengan cara sampel yang sudah di preparasi ditambahkan baku standar dengan konsentrasi 2, 4, 6 ppm sebanyak 1 mL. Kemudian disuntikan dengan volume injeksi sebesar 40 µL ke dalam kolom KCKT. Setelah itu hitung % *recovery* yang dihasilkan (Harmita, 2004: 119).

$$\%Perolehan\ kembali = \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*}\ x\ 100$$

Keterangan :
C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran
C_A = konsentrasi sampel sebenarnya
C_A = konsentrasi analit yang ditambahkan

4.4.5. Uji kesesuaian sistem

Larutan baku disuntikan sebanyak 6 kali. Kemudian data resolusi (daya pisah), presisi, faktor asimetri puncak, efisiensi kolom dan faktor kapasitas dicari nilai RSD, syarat nilai RSD yang memenuhi syarat yaitu< 2%.

repository.unisba.ac.id