

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1 Pengumpulan Sampel

Penelitian menggunakan 2 sampel sarang lebah dari spesies yang berbeda dan tempat pembudidayaan yang berbeda. Sarang lebah pertama dengan spesies *Trigona sp*, pembudidayaan di Kampung Cibeusi, Desa Palasari, Ciater, Subang, merupakan sarang lebah yang dibudidayakan di daerah hutan yang jauh dari pemukiman. Sedangkan sarang lebah kedua dengan spesies *Apis cerana*, pembudidayaan di Kampung Cikendung, Cipunagara, Subang, merupakan sarang lebah yang dibudidayakan di daerah pemukiman penduduk setempat.

4.2 Pembuatan Larutan Pereaksi

4.2.1 Pembuatan Larutan Baku

Sebanyak 10 mg tetrasiklin ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas. Hingga diperoleh larutan baku tetrasiklin 1000 ppm. Selanjutnya larutan baku tetrasiklin dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas untuk membuat larutan baku tetrasiklin 100 ppm. Selanjutnya larutan baku tetrasiklin 100 ppm dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas untuk membuat larutan baku tetrasiklin 10 ppm.

4.2.2 Pembuatan Larutan Trikloroasetat 20 %

Sebanyak 2 gram trikloroasetat dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan aquades hingga batas.

4.2.3 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat

Larutan Buffer Sitrat pH 4 dibuat dengan penggabungan larutan asam sitrat 0,1 M dan larutan natrium sitrat 0,1 M. Larutan asam sitrat dibuat dengan cara menimbang 960,6 mg asam sitrat, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dan dilarutkan dengan aquades hingga batas. Larutan natrium sitrat 0,1 M dibuat dengan cara menimbang 645,17 mg natrium sitrat, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan aquades. Pembuatan larutan buffer sitrat dibuat dengan cara mengambil 33 ml larutan asam sitrat dan 17 ml larutan natrium sitrat, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan di larutkan dengan aquades hingga batas. Kemudian dilakukan pemastian pH 4 dengan menggunakan pH meter.

4.2.4 Pembuatan Metanol 5 %

Sebanyak 2,5 ml metanol dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, kemudian dilarutkan dengan aquabides hingga batas.

4.2.5 Pembuatan Larutan Metanol Oksalat

Dibuat larutan metanol oksalat 0,01 M dalam 25 ml. Sebanyak 31,52 mg asam oksalat dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan metanol hingga batas.

4.2.6 Pembuatan Fase Gerak

Larutan asam oksalat 0,0025 M dilarutkan dalam 200 ml aquabides dan dicampur asetonitril sebanyak 50 ml, sehingga didapatkan perbandingan 4:1.

Perbandingan fase gerak dalam pengoprasian KCKT adalah metanol : campuran pelarut (asam oksalat 0,0025 M-asetonitril 4:1) dengan perbandingan 90:10.

4.3. Uji Kesesuaian Sistem

Konsentrasi larutan baku yang telah dibuat sebelumnya disuntikkan sebanyak 7 kali ke dalam KCKT. Parameter yang diamati adalah waktu retensi dan luas area, lalu dihitung simpangan baku relatif. Syarat simpangan baku relatif untuk UKS adalah $< 2 \%$.

4.4 Preparasi Sampel

Sampel sarang lebah ditimbang 5 gram dimasukkan ke dalam gelas kimia, ditambahkan 2 ml asam trikloroasetat (TCA) dan 20 ml buffer sitrat. Kemudian diaduk selama 1 menit dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Lapisan supernatan yang di dapat dipisahkan untuk selanjutnya dilakukan ECC. Kemudian dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menggunakan n-heksana sebanyak 30 ml selama 5 menit yang dilakukan sebanyak 3 kali. Kolom SPE sebelumnya diaktifkan terlebih dahulu dengan menggunakan 10 ml metanol dan 10 ml air. Setelah itu dimasukkan sebanyak 10 ml sampel, kolom dicuci dengan 5 ml air yang mengandung 5% metanol (v/v) dan analit dielusi dengan 10 ml metanol oksalat. Hasil elusi dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml lalu diencerkan dengan larutan metanol hingga tanda batas. Sampel kemudian disaring

menggunakan membran filter dengan ukuran 0,45 μm untuk dianalisis dengan KCKT.

4.4.1 Analisis menggunakan KCKT

Aliquot diinjeksikan ke dalam KCKT Agilent 1220. Kondisi KCKT sebagai berikut :

Kolom : ODS (Oktadesil silika)

Sistem : terbalik

Fase gerak : metanol : campuran pelarut (asam oksalat 0,0025 M-asetonitril 4:1) dengan perbandingan 90:10

Volume injeksi: 40 μl

Laju Alir : 0,1 mLmin⁻¹

Detektor : UV (355 nm)

4.5 Validasi Metode Analisis

4.5.1 Linieritas

Larutan baku 10 ppm dipipet menggunakan pipet volume sebanyak 1 ml dimasukan ke dalam labu ukur 10 ml lalu diencerkan dengan larutan metanol hingga tanda batas untuk mendapat larutan baku 1 ppm dan dilakukan pengenceran dengan cara memipet menggunakan pipet volume sebanyak 1;3;5;7;9 ml dan masing-masing dimasukan ke dalam labu ukur 10 ml lalu diencerkan dengan larutan metanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 0,9 ppm. Dan dari larutan baku 0,1 ppm dipipet 8 ml dimasukan ke dalam labu ukur 10 ml lalu diencerkan dengan larutan metanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan baku dengan konsentrasi

0,08 ppm. Larutan tersebut dibuat sebelum penyuntikan. Kemudian masing-masing larutan baku disaring dengan membran filter 0,45 µm dan disuntikkan ke dalam kolom KCKT. Lalu dicatat dan dibuat kurva kalibrasi (kurva konsentrasi terhadap luas area).

4.5.2 Akurasi

Dibuat larutan baku tetrasiklin 0,5 ; 0,8 ; 0,9 ppm. 5 gram sampel ditambah 2 ml TCA dan 20 ml buffer sitrat, kemudian masing-masing ditambahkan larutan baku tetrasiklin 0,5 ; 0,8 ; 0,9 ppm, lalu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit, supernatan hasil sentrifugasi diambil lalu dilakukan ECC dengan n-heksana sebanyak 30 ml selama 5 menit yang dilakukan sebanyak 3 kali. Hasil ECC kemudian di SPE dengan kolom C-18, hasil elusi dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml lalu diencerkan dengan larutan metanol hingga tanda batas,. Sampel kemudian disaring menggunakan membran filter dengan ukuran 0,45 µm untuk dianalisis dengan KCKT sebanyak 3 kali. Didapatkan nilai % *recovery* (perolehan kembali) dengan rumus :

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{\text{konsentrasi hasil}}{\text{konsentrasi standar}} \times 100 \% \dots \dots \dots (1)$$

4.5.3 Presisi

Prosedur yang digunakan sama dengan akurasi namun digunakan konsentrasi 0,5 ppm dan diinjek sebanyak 6 kali, kemudian dihitung % RSD dengan cara sebagai berikut :

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

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3)$$

Dimana :

RSD = Standar Deviasi Relatif (%)

SD = Standar Deviasi

\bar{X} = X rata-rata

4.5.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Penentuan batas deteksi LOD dan LOQ menggunakan prosedur yang sama dengan uji linieritas sehingga hasil linieritas yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan LOD dan LOQ dengan menggunakan rumus :

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum(y-\bar{y})^2}}{n-2} \dots\dots\dots(4)$$

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} \dots\dots\dots(5)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b \text{ (slope)}} \dots\dots\dots(6)$$

Batas deteksi dinyatakan sebagai konsentrasi analit pada saat respon menunjukkan ratio signal-noise 3:1 (S/N=3). Batas deteksi (LOD/Q) merupakan hasil perkalian simpangan baku blangko dengan suatu faktor (nilai=3), dimana b merupakan kemiringan garis regresi linier. Sedangkan batas kuantifikasi (LOQ/Q) adalah merupakan hasil perkalian simpangan baku blangko dengan suatu faktor (nilai=10), dimana b merupakan kemiringan garis regresi linier. Ratio signal-noise (S/N) = 10.