

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pembuatan Sampel

Bebek yang berasal dari peternakan direbus menggunakan parasetamol sebagai pengempuk. Sampel ini dibuat tiga dengan jumlah parasetamol yang berbeda-beda. Pembuatan sampel dilakukan sebanyak satu kali.

4.2. Preparasi Sampel

Prosedur berdasarkan pada Aziz (2005) dengan modifikasi. Sampel daging bebek yang telah dihomogenkan dengan cara diblender ditimbang sebanyak 10 gr, ditambahkan dengan 10 mL trikloroasetat 1% dan ditambahkan dengan 25 mL asetonitril, dikocok selama 20 menit lalu disaring dan dipisahkan filtratnya. Residu daging bebek ditambahkan lagi dengan asetonitril 25 mL. Filtrat kemudian dipisahkan kedalam corong pisah dan ditambah 20 mL *n*-heksan dan kocok kuat selama 10 menit, buang lapisan *n*-heksan dan simpan lapisan asetonitrilnya. Tahap ini dilakukan sebanyak dua kali. Pekatkan fasa asetonitril menggunakan penangas air hingga 5 mL. Hasil pemekatan masukkan kedalam kolom SPE. Proses ekstraksi dilanjutkan dengan pemurnian sampel menggunakan SPE *cartridge* C18.

4.3. Pemisahan Sampel

Kolom SPE diaktifkan terlebih dahulu dengan 10 mL metanol. Setelah itu dimasukkan sebanyak 5 mL sampel, kolom dicuci dengan 5 mL air dan

didiamkan. Kemudian kolom tersebut dielusi dengan 5 mL etanol. Setelah itu, ekstrak diambil 1 mL dipindahkan dalam labu takar 10 ml kemudian dilarutkan dengan fase gerak lalu saring menggunakan membran filter 0,45 µm. Sampel sebanyak 40 µL dianalisis dengan KCKT.

4.4. Analisis Kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis

Dibuat fase gerak etil asetat dan asam asetat glasial dengan perbandingan 95:5 kemudian masukkan kedalam chamber lalu jenuhkan. Plat KLT yang telah ditotolkan larutan standar dan larutan uji dimasukkan ke dalam chamber lalu biarkan terelusi. Plat KLT yang telah terelusi diamati dibawah lampu UV 256.

4.5. Analisis Parasetamol dengan Metode KCKT

kromatografi cair kinerja tinggi yang digunakan adalah KCKT agilent 1220 dengan kondisi kolom Zorbax® C-18 (250 x 4,6 mm), fase gerak akuabides dicampur dengan metanol dan asam asetat dengan perbandingan 71:26:3, laju alir 1,5 mL/menit dan detektor UV dengan panjang gelombang 275 nm.

4.5.1. Pembuatan fase gerak

Dibuat campuran akuabides: metanol: asam asetat dengan perbandingan 71:26:3.

4.5.2. Pembuatan larutan baku

Sebanyak 10 mg parasetamol ditimbang. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. dilarutkan dengan fase gerak hingga tanda batas sehingga

diperoleh larutan baku parasetamol 1000 ppm. Selanjutnya dibuat larutan baku parasetamol dengan konsentrasi 50; 100; 200; 250; 300; 400 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.3. Analisis sampel

Analisis dilakukan untuk menetapkan kadar parasetamol yang terdapat dalam daging bebek yang direbus menggunakan parasetamol dengan jumlah parasetamol yang berbeda-beda yaitu 250; 500; 1000 mg. Hasil preparasi berupa larutan kemudian disaring menggunakan membran filter 0,45 μm lalu disuntikkan ke KCKT.

4.5.4. Uji kesesuaian sistem

Konsentrasi larutan baku yang telah dibuat sebelumnya disuntikkan sebanyak 6 kali ke dalam KCKT.

4.6. Validasi Metode Analisis

4.6.1. Presisi

Sampel dipipet kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Ditambahkan larutan standar dengan konsentrasi berturut-turut 200 ppm. Selanjutnya larutan tersebut ditambahkan fase gerak hingga tanda batas 10 mL, disaring menggunakan membran filter 0,45 μm kemudian disuntikkan ke dalam kolom KCKT.

4.6.2. Akurasi

Sampel dipipet kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, Kemudian ditambahkan larutan standar dengan konsentrasi berturut-turut 100,

200, dan 300 ppm. Selanjutnya masing-masing ditambahkan dengan fase gerak hingga tanda batas 10 mL, disaring menggunakan membran filter 0,45 µm kemudian disuntikkan ke KCKT.

4.6.3. Linieritas

Larutan baku 1000 ppm dipipet menggunakan pipet volume sebanyak 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 4 mL dan masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml diencerkan dengan larutan fase gerak hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 50; 100; 200; 250; 300; 400 ppm. Larutan tersebut dibuat sesaat sebelum penyuntikan. Masing-masing larutan disaring menggunakan membran filter 0,45 µm dan disuntikkan ke KCKT. Kemudian dicatat dan dibuat kurva konsentrasi terhadap luas area (kurva kalibrasi).

4.6.4. Penetapan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi diperoleh dari data linieritas. Adapun persamaannya adalah $LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b}$, $LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$