

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1 Pengumpulan Sampel

Lima sampel madu yang diperoleh di kota Bandung yang merupakan sampel madu yang sebelumnya digunakan dalam penelitian pendahuluan.

4.2 Ekstraksi Madu

4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis

250 mg sampel diekstraksi dengan campuran etil asetat dan aquadest (8:2) dengan menggunakan corong pisah selama 15 menit hingga menghasilkan filtrat dan residu. Filtrat diambil sebelumnya dipekatkan terlebih dahulu dengan menggunakan waterbath untuk kemudian ditotolkan pada plat KLT dengan larutan elusi kloroform dan metanol (9:1) hingga melulusi secara sempurna. Selanjutnya spot yang didapat dikrok dan dilarutkan dengan fase gerak untuk diinjektikan ke dalam sistem KCKT yang sebelumnya dilakukan penyaringan melalui membran filter 0,45 μm .

4.2.2 Analisis Tetrasiklin dengan KCKT

Tetrasiklin dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT Agilent 1220) dengan kondisi kolom Zorbax $\text{\textcircled{R}}$ C-18 ZORBAX ODS (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase gerak metanol : asetonitril : 0,01M asam oksalat (73:17:10), laju alir 1 mL/min, dan detektor UV dengan panjang gelombang 355nm.

4.3 Analisis Antibiotika Tetrasiklin Dengan Metode KCKT

4.3.1 Pembuatan Fase Gerak

Pada tetrasiklin dibuat campuran metanol : asetonitril : 0,01M asam oksalat dengan perbandingan 73 : 17 : 10.

4.3.2 Pembuatan Larutan Baku

Sebanyak 25 mg tetrasiklin ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, dilarutkan dengan fase gerak hingga tanda batas. Hingga diperoleh larutan baku tetrasiklin 1000 ppm. Selanjutnya larutan baku tetrasiklin dipipet sebanyak 1 ml dan dilarutkan dalam labu ukur 10 ml untuk membuat larutan baku tetrasiklin 100 ppm.

4.3.3 Uji Kesesuaian Sistem

Konsentrasi larutan baku yang telah dibuat sebelumnya disuntikkan sebanyak 7 kali ke dalam KCKT. Dilihat luas area dan waktu retensi lalu hitung nilai simpangan baku residual (SBR).

4.4 Verifikasi Metode Analisis

4.4.1 Akurasi dan Presisi

Penentuan akurasi dan presisi dilakukan dengan membuat 3 konsentrasi yaitu 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm. Sampel dipipet sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan standar masing-masing 1 mL, 1,5 mL dan 2 mL kedalam botol vial. Selanjutnya larutan siap disuntikkan setiap konsentrasi sebanyak tiga kali ke dalam kolom KCKT.

4.4.3 Linieritas

Penentuan linieritas dilakukan dengan cara membuat larutan baku dengan konsentrasi 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml diencerkan dengan larutan fase gerak hingga tanda batas. Larutan tersebut dibuat sesaat sebelum penyuntikan. Masing-masing larutan disaring menggunakan membran filter 0,24 μm dan disuntikkan ke dalam kolom KCKT. Kemudian dicatat dan dibuat kurva konsentrasi terhadap luas area (kurva kalibrasi) dengan persamaan garis lurus (regresi linier) $y = bx + a$.