

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Preparasi sampel

Daging bebek yang direbus dengan parasetamol dihaluskan menggunakan blender dan ditimbang sebanyak 10 g kemudian dipreparasi dengan menambahkan asam trikloroasetat 1% sebagai zat pengendap protein. Lalu tambahkan asetonitril yang berfungsi sebagai pelarut parasetamol dalam daging bebek dan dilakukan filtrasi. Filtrat diekstraksi cair-cair dengan menambahkan *n*-heksan yang berfungsi melarutkan lemak. Tahapan ekstraksi cair-cair ini diulang sebanyak dua kali. Fase *n*-heksan dibuang dan fase hasil ekstraksi cair-cair lainnya dilakukan pemekatan menggunakan penangas air. Lalu disentrifugasi untuk mengendapkan kembali protein pengotor dalam larutan sampel yang dipisahkan dengan cara dekantasi.

5.2. Pemisahan dengan SPE

Proses pemisahan analit dari pengotor dilanjutkan dengan menggunakan SPE. Tahap pertama dilakukan pengkondisian dengan mengalirkan metanol ke dalam kolom SPE, hal ini bertujuan untuk membasahi permukaan penjerap dan untuk menciptakan kondisi yang sama sehingga dapat menghindari perubahan-perubahan kimia yang terjadi ketika sampel dimasukkan. Tahap kedua yaitu retensi atau dimasukkannya sampel ke dalam kolom bertujuan untuk menahan analit yang diharapkan sementara komponen lain terelusi atau menahan pengotor

yang terdapat dalam sampel sementara analit yang dikehendaki terelusi. Tahap ketiga adalah pembilasan digunakan air yaitu untuk membilas komponen yang tidak tertahan dalam penjerap kolom dan tahap keempat adalah elusi dengan etanol yang bertujuan untuk mengambil analit yang dikehendaki jika analit tertahan dalam penjerap. Adapun hasil tiap tahapan SPE adalah sebagai berikut::

Tabel V.1 Hasil Warna Setiap Tahapan SPE

Tahap	Hasil
pengkondisian	bening
retensi	kuning
pembilasan	kuning bening
elusi	bening

Berdasarkan data di atas diperoleh data bahwa pada tahap pengkondisian, hasil tampungan berupa warna bening, tahap retensi berwarna kuning hal ini sesuai dengan warna asal dari sampel dan kuning bening untuk tahap pembilasan karena terdapat sedikit sampel di dalamnya serta berwarna bening untuk tahap elusi.

5.3. Analisis Kualitatif Parasetamol menggunakan KLT

Analisis kualitatif menggunakan KLT diawali dengan melakukan optimasi fase gerak menggunakan parasetamol standar sebagai larutan uji dengan berbagai pelarut dalam perbandingan yang berbeda sehingga diperoleh data sebagai berikut:

Tabel V.2 Optimasi Fase Gerak KLT

Fase Gerak	Rf
kloroform:aseton : ammonium hidroksida (8:2:0,1)	0,85
<i>n</i> -heksan : etil asetat (1:1)	0,13
etil asetat : asam asetat (95:5)	0,73
<i>n</i> -heksan : aseton (75:25)	-
<i>n</i> -heksan :aseton (tidak dijenuhkan) (75:25)	0,2

Penggunaan KLT ini dilakukan bertujuan untuk memantau keberadaan parasetamol di setiap tahap yang dilakukan. Berdasarkan hasil optimasi diambil fase gerak etil asetat (95:5) karena bercak dan Rf yang diperoleh lebih baik yaitu 0,73.

Pemantauan parasetamol menggunakan KLT dilakukan terhadap filtrat asetonitril sebelum ditambahkan dengan *n*-heksan (A_{sb}); fraksi asetonitril setelah preparasi (A_{sa}); air rebusan daging bebek (air); fasa *n*-heksan 1 (nH_1) dan fasa *n*-heksan 2 (nH_2) dan diperoleh data sebagai berikut:

Tabel V.3 Hasil Analisis Kualitatif Parasetamol Setiap Tahapan Preparasi Sampel

Sampel	Rf	Kepekatan Spot
Pembanding	0,70	+++
Asb	0,70	+
Asa	0,70	++
air	-	-
nH_1	-	-
nH_2	-	-

Berdasarkan data di atas diperoleh hasil bahwa terdapat parasetamol pada filtrat asetonitril sebelum dicampurkan *n*-heksan. Parasetamol juga terdapat pada fraksi asetonitril siap SPE serta tidak terdapat parasetamol pada air rebusan, dan fraksi *n*-heksan.

selanjutnya dilakukan pemantauan KLT terhadap larutan sampel dari tiap tahap SPE dan diperoleh data sebagai berikut :

Tabel V.4 Hasil Identifikasi Parasetamol pada SPE 1

kondisi	pelarut	hasil
pengkondisian	metanol:air	-
retensi	sampel	+++
pembilasan	metanol 5%	+
elusi	etanol	-

Tabel V.5 Hasil Identifikasi Parasetamol pada SPE 2

Kondisi	Pelarut	Hasil
pengkondisian	metanol	-
retensi	sampel	+++
pembilasan	air	+
elusi	etanol	-

Dalam teknik SPE, dilakukan dua modifikasi pelarut SPE untuk mencari pelarut yang efektif sehingga diperoleh bahwa penggunaan SPE untuk mengambil analit berupa parasetamol yang lebih bebas dari pengotor diketahui terdapat dalam tahap kedua (retensi) dan ketiga (pembilasan), hal ini terjadi karena analit tidak dapat terjerap sepenuhnya di dalam penjerap karena sifat dari penjerap yang nonpolar walaupun telah diciptakan kondisi yang sesuai dengan analit. Hasil tersebut berdasarkan pengamatan menggunakan KLT.

Plat KLT pertama-tama dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105,5⁰C selama 1 jam yang bertujuan untuk mengaktifkan adsorben karena berada dalam kondisi anhidrat sehingga akan mengadsorbsi analit lebih kuat. Fase gerak

dijenuhkan menggunakan kertas saring *Whatman No.41* dan dalam kondisi tertutup rapat, hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan proses elusi.

Plat KLT yang telah ditotolkan kemudian dimasukkan ke dalam chamber kemudian biarkan terelusi hingga batas atas KLT. Plat KLT yang telah terelusi diangkat, lalu diamati bercak dan Rf yang terbentuk apakah sebanding dengan standar parasetamol dibawah lampu UV 254. Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh bercak dan Rf yang sama terhadap standar, hal ini menunjukkan bahwa prosedur yang dilakukan dapat menarik analit dari sampel dimana terdapat analit pada tahap kedua dan ketiga dari SPE.

5.4. Analisis Parasetamol dengan Metode KCKT

Parasetamol dianalisis dengan sistem kromatografi fase terbalik, dimana fase diam yang digunakan bersifat nonpolar yaitu C-18 dengan fase gerak yang digunakan bersifat polar. Fase gerak yang digunakan, berupa campuran aquabidestilata, metanol dan asam asetat glasial. Parasetamol dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 275 nm.

5.4.1 Optimasi Fase Gerak

Tahap awal yang dilakukan sebelum analisis sampel terlebih dahulu dilakukan optimasi fase gerak yang bertujuan untuk menghasilkan analisis yang baik dengan melihat perbandingan fase gerak yang mampu menghasilkan peak standar yang sesuai syarat. Fase gerak yang digunakan berupa campuran aquabidestilata, metanol dan asam asetat dengan perbandingan volume 71: 26: 3. Aquabidestilata digunakan karena merupakan kandungan utama fase gerak fase

terbalik dan ditambahkan metanol untuk mengatur kepolaran fase gerak dalam hal ini meningkatkan kepolaran fase gerak agar mampu memisahkan analit dari pengotor dan dapat menarik analit untuk keluar dari kolom terlebih dahulu dibandingkan matriks yang sifatnya kurang polar dari analit. Dapat pula ditambahkan asam asetat glasial untuk menghindari terjadinya *tailing* dengan mempertahankan kepolaran fase gerak.

Standar parasetamol 100 ppm yang dilarutkan dengan metanol pro KCKT di injikkan dengan fase gerak akuabidestilata, metanol dan asam asetat (69:28:3) dan laju alir 1 ml/menit, diperoleh waktu retensi 4,137 menit, puncak yang tidak simetris dan tidak lancip serta ditemukan banyak pengotor dengan waktu analisis 10 menit. Puncak yang dihasilkan tidak sesuai diharapkan sehingga dilakukan penggantian pelarut untuk standar dengan dilarutkannya menggunakan fase gerak dan mengganti perbandingan fase gerak aquabidestilata, metanol dan asam asetat (71: 26: 3) dan laju alir 1,5 ml/menit, diperoleh waktu retensi 2,887 menit, puncak yang lancip dan simetris serta tidak ditemukan banyak pengotor dengan waktu analisis 5 menit. Hasil pengujian tersebut memberikan hasil yang lebih baik sehingga sistem tersebut digunakan untuk tahap analisis selanjutnya.

5.4.2 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan bertujuan untuk memastikan bahwa hasil analisis sesuai dengan nilai sebenarnya atau menjamin bahwa metode tersebut dapat memberikan hasil yang optimum dalam pengujian. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menyuntikkan larutan standar 100 ppm sebanyak enam kali.

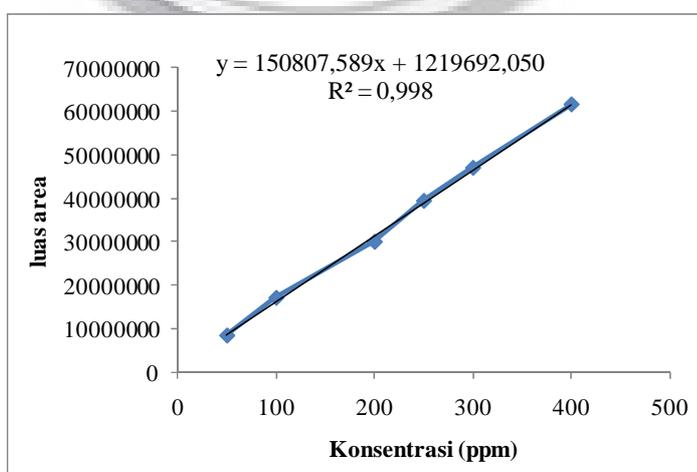
Tabel V.6 Data Uji Ksesuaian Sistem

Penyuntikan Ke	Luas Area	Waktu Retensi
1	16681684	2,917
2	17136771	2,893
3	16914451	2,913
4	16916940	2,897
5	16827435	2,890
6	16820995	2,910
Jumlah	101298276	17,420
Rata-rata	16883046	2,903
SD	150997,363	0,011
SBR	0,894	0,393

Dari hasil perhitungan didapat nilai simpangan baku relatif (SBR) sebesar 0,894 %. Dapat disimpulkan bahwa perolehan nilai UKS memenuhi persyaratan karena kurang dari 2 %.

5.4.3 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dilakukan bertujuan untuk melihat hubungan antara konsentrasi analit terhadap respon alat. Kurva kalibrasi dilakukan terhadap larutan standar dibuat dengan konsentrasi 50; 100; 200; 250; 300; 400 ppm. Berikut ini kurva yang diperoleh :



Gambar V.1 Kurva Kalibrasi Parasetamol

Dari hasil gambar kurva kalibrasi didapat persamaan garis $y = 150807,589x + 1219692,050$. Selain itu juga diketahui koefisien korelasinya yaitu 0,998 yang dapat disimpulkan bahwa pengujian linieritas ini memenuhi persyaratan karena nilai koefisien korelasi (r) mendekati 1.

5.4.4 Analisis Sampel

Dilakukan analisis sebanyak tiga sampel dan diperoleh hasil bahwa parasetamol terdeteksi oleh KCKT.

Tabel V.7 Data Uji Sampel

Sampel	Luas Area	Konsentrasi (ppm)
A	27970341	177,383
B	41156926	264,822
C	56350603	365,571
D	15422000	94,175
E	13282212	79,986
F	16518613	101,447

Tabel V.8 Data Jumlah Konsentrasi Sampel

Sampel	Konsentrasi (ppm)
1	271,558
2	344,809
3	467,018

Berdasarkan data diatas disimpulkan bahwa sampel satu dideteksi dengan kadar 271 ppm, sampel dua 344,809 ppm, dan sampel tiga 467,018 ppm.

5.5 Validasi Metode Analisis

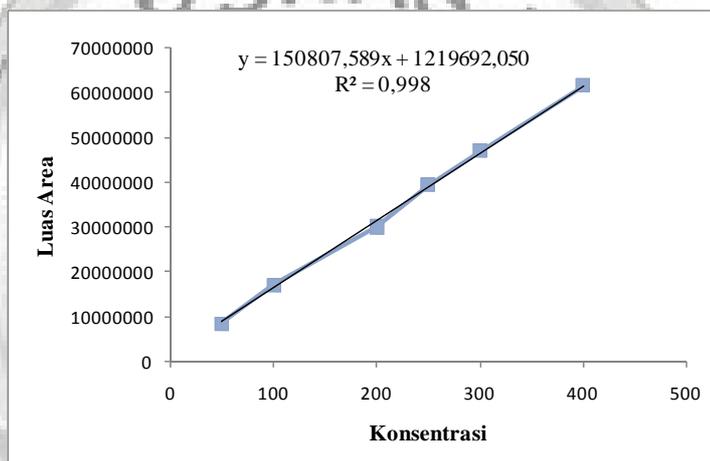
Validasi metode analisis dilakukan bertujuan untuk menjamin bahwa metode yang dikerjakan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Parameter-

parameter yang digunakan dalam analisis kali ini adalah kecermatan, keseksamaan, linieritas, batas deteksi, dan batas kuantitasi.

5.5.1 Linieritas

Linieritas dilakukan dengan tujuan untuk melihat kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan (Gandjar, 2007: 469). Suatu analisis dapat dikatakan valid dengan melihat koefisien korelasi (r^2) mendekati 1.

Berikut ini kurva linieritas :



Gambar V.2 Kurva Linieritas

Linieritas dilakukan dengan membuat larutan standar dengan konsentrasi 50; 100; 200; 250; 300; 400 ppm. Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y=150807,589x+1219692,050$ dengan koefisien korelasi 0,998. Dari persamaan tersebut dapat diperoleh harga simpangan baku residual ($S_{y/x}$) sebesar 878575,156, standar deviasi (S_{x0} atau SD) 5,826 dan koefisien variansi (V_{x0}) 2,689%. Berdasarkan nilai yang diperoleh diketahui koefisien korelasi dari kurva kalibrasi mendekati 1 dan nilai koefisien variansi $< 5\%$, hal ini menunjukkan bahwa alat

KCKT dapat memberikan respon yang sebanding terhadap konsentrasi parasetamol.

5.5.2 Batas Deteksi

Hasil uji batas deteksi dihitung berdasarkan kurva kalibrasi parasetamol terhadap luas area kromatogram dikali dengan bilangan faktor yaitu 3 dan dibagi dengan b dari persamaan regresi hasil dari kurva kalibrasi. Nilai batas deteksi yang diperoleh dari kurva kalibrasi adalah 17,447 ppm.

5.5.3 Batas Kuantitasi

Penentuan batas kuantitasi sama dengan batas deteksi, namun bilangan faktornya, yaitu 10. Sehingga diperoleh batas kuantitasi yang adalah 58,258 ppm.

5.5.4 Akurasi (Ketepatan)

Akurasi melihat ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi dilakukan dengan metode standar adisi dimana satu sampel dan ditambahkan dengan larutan standar dengan tiga konsentrasi yang berbeda yaitu 100; 200; 300 ppm dan diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel V.9 Data akurasi

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Perolehan Kembali (%)	Rentang
A	100	104,269 ± 1,29	96,926-104,269
	200	96,926 ± 0,62	
	300	101,828 ± 0,74	

Berdasarkan data diatas diperoleh rentang 96,93-104,27%. Pada pengujian akurasi memenuhi kriteria akurasi dimana rentang yang sebenarnya adalah 80-150 %. namun jika dilihat dimana persen perolehan kembali untuk konsentrasi

100 ppm melebihi 100%, hal ini karena keberadaan pengotor yang masih tertinggal dan adanya respon alat terhadap pengotor tersebut.

5.5.5 Presisi (Keseksamaan)

Presisi dilakukan dengan melihat ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar, 2007: 466). Dokumentasi presisi mencakup simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatif (RSD). Suatu metode analisis dianggap baik jika memiliki nilai simpangan baku dan simpangan relatif sama dengan atau kurang dari 2% (Gandjar, 2007: 466).

Tabel V.10 Data Presisi

Sampel	Pengukuran	Luas Area	Kadar (x)	(X - rata-rata)	(X - rata-rata) ²
A	1	28920078	183,680	0,366	0,134
	2	28600034	181,558	-1,756	3,083
	3	28883080	183,435	0,121	0,015
	4	28844636	183,180	-0,134	0,018
	5	29029225	184,404	1,090	1,189
	6	28911824	183,626	0,312	0,097
		Rata-rata	183,314	Jumlah	4,535
				SD	0,952
				RSD	0,520

Uji presisi dilakukan untuk melihat kedekatan antara hasil uji yang dilakukan secara berulang pada sampel. Konsentrasi yang diambil untuk menghitung presisi ini adalah 200 ppm. Dari hasil perhitungan didapat nilai simpangan baku 0,952 dengan nilai koefisien variansi atau nilai RSD sebesar 0,52%. Dapat disimpulkan bahwa hasil presisi memenuhi persyaratan dimana syarat presisi adalah $\leq 2\%$.