

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental laboratorik yaitu dengan melakukan observasi pada saus yang diduga mengandung Rhodamin B dan dilakukan analisis secara kualitatif dan kuantitatif di laboratorium.

Penelitian ini mengambil sampel saus di pasar Gamping Kabupaten Sleman dengan kriteria inklusi saus tidak terdaftar pada Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM).

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Waktu penelitian dimulai dari bulan Oktober 2017 sampai Februari 2018, tahap pada penelitian ini meliputi tahap persiapan, pelaksanaan, dan tahap penyelesaian

C. Instrumen Penelitian

1. Alat

Timbangan Analitik (Mettler Tolloedo®), Hot Plate (Cimarec®), Membran Filter 0,45 µm (Whatman no 42®), Corong Buchner, Corong Pisah, Pipet Volume Erlenmeyer 250 ml Gelas Kimia, Labu Ukur, Spektrofotometri Uv-Vis Double Beam (Jasco V-730®), Syringe (Hamilton®), Camber KLT (Camag®).

2. Bahan

Rhodamin B, Saus A (Prima Sari), Saus B (Niki Harum), Saus C (Tidak Bermerk), aquadest, ammonia, Etanol, NaOH, Dietileter, HCl, asam asetat, n-Butanol, Lempeng KLT silica gel GF 254, Benang Wol.

D. Cara Kerja

1. Metode Spektrofotometri Uv-Vis

Analisis Rhodamin B bisa dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis (BPOM, 2006). Metode analisis menggunakan Spektrofotometri berdasarkan penelitian dari Putri (2009) yang dimodifikasi :

a. Pembuatan Larutan Baku

Menimbang larutan 100 mg dan dilarutkan dalam 0,1 liter HCl 0,1 N dan didapat konsentrasi 1000 ppm kemudian diencerkan dan dibuat enam seri kadar dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6, 7 ppm.

b. Pembuatan Larutan Sampel

Pembuatan larutan sampel dengan cara menimbang lima gram saus dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml. Larutan kemudian ditambahkan 100 ml yang terdiri dari amonia 2% dalam etanol 70%, larutan didiamkan selama 1 hari. Larutan kemudian disaring menggunakan *Whatman* no. 42 dan diuapkan selama 4 jam sampai pekat.

Larutan kemudian ditambahkan aquades 30 ml dan diaduk, dimasukkan dalam corong pisah 250 ml dan ditambahkan 6 ml natrium hidroksida 10 %, kemudian diekstraksi dengan 30 ml dietileter dan digojok sampai membentuk 2 lapisan yaitu lapisan eter jernih (dibagian atas) dan air merah (dibagian bawah), pisahkan hingga hanya tersisa ekstrak eter. Ekstrak eter kemudian dicuci dengan larutan natrium hidroksida 0,5% sebanyak 5 ml, larutan digojok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan eter (atas) dan larutan berwarna coklat (bawah).

Larutan yang berwarna coklat dipisahkan hingga hanya ekstrak eter dan diekstraksi 3 kali dengan 10 ml asam klorida 0,1 N hingga lapisan eter tidak berwarna lagi, ekstrak asam klorida ditampung dalam labu takar 50 ml dan ditambahkan HCl sampai dengan volume 50 ml. Larutan baku dan larutan sampel diukur dengan spektrofotometri UV-Vis *double beam* dengan panjang gelombang 450 nm – 700 nm.

c. Identifikasi dengan Spektrofotometri

1) Pembuatan kurva baku

Seri kadar Rhodamin B diukur panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometri UV-Vis, kemudian seri kadar dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6, 7 ppm masing masing diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal, kemudian akan diperoleh kurva konsentrasi, sebagai blanko digunakan HCl 0,1 N

2) Penetapan Kadar Rhodamin B

Sampel yang telah disiapkan diukur serapannya pada panjang gelombang 557 nm, dan dihitung kadar Rhodamin B dalam sampel dengan kurva kalibrasi persamaan regresi : $y = ax+b$

Perhitungan kadar Rhodamin B menggunakan rumus :

$$K = \frac{X \cdot V \cdot Fp}{Bs}$$

Keterangan :

- K = Kadar Rhodamin B dalam sampel (mcq/g)
- X = Kadar Rhodamin B setelah pengenceran
- V = Volume sampel (ml)
- Fp = Faktor pengenceran
- Bs = Berat sampel

2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prinsip kerja KLT didasarkan pada perbedaan kepolaran sampel, analisis Rhodamin B menggunakan KLT dilihat dengan membandingkan nilai R_f baku dengan sampel, dan saat dilihat secara visual bewarna merah jambu, kemudian saat dilihat dibawah lampu UV 254 nm berflourosensi kuning atau oranye. Identifikasi sampel menggunakan Plat KLT GF 254 dengan fase gerak berupa n-Butanol : asam asetat : ammonia (10:4:5).

Prosedur Analisis berdasarkan penelitian berdasarkan penelitian dari Utami dan Suhendi (2009) :

a. Pembuatan Larutan Baku Pembanding

Pembuatan larutan baku pembanding dibuat dengan menimbang 100 mg Rhodamin B dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest

b. Pembuatan Sampel

Memimbang sepuluh gram saus dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 100 ml yang terdiri dari amonia 2% dalam etanol 70%, larutan didiamkan selama 1 hari. larutan didiamkan selama 1 hari. Larutan kemudian disaring menggunakan *whatman* no 42 dan dipanaskan diatas hot plate. Residu penguapan ditambahkan 10 ml aquades dan 5 ml asetat 5 %. Memasukan benang wol dengan ukuran 15 cm kedalam larutan dan didihkan larutan tersebut sehingga pewarna akan terikat dengan benang wol, angkat benang wol dan larutkan dalam 10 ml larutan amonia 10 % (dalam etanol 70%) dan dipanaskan hingga warna benang wol luntur. Larutan tersebut digunakan sebagai sampel pada analisa KLT.

c. Identifikasi Sampel dengan KLT

1) Plat KLT GF 254

Panaskan plat GF 254 dengan ukuran 4 x 10 cm diatas hot plate dengan suhu 110 °C selama 15 menit, setelah itu beri tanda 1 cm diatas dan 1 cm dibawah dengan pensil.

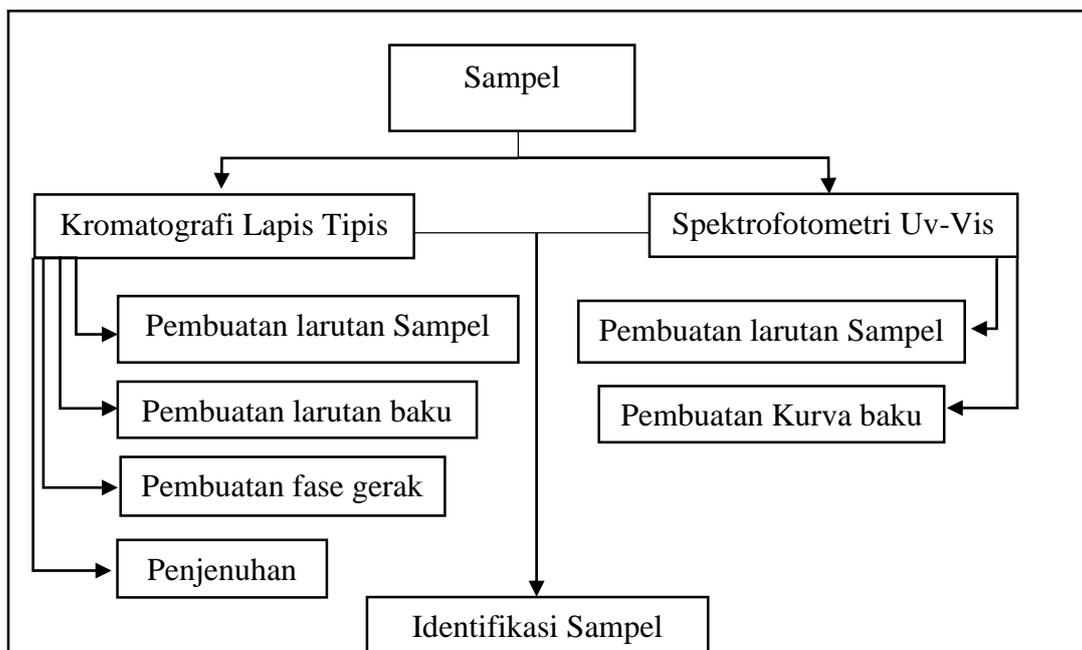
2) Penjenuhan

Fase gerak berupa n-Butanol : asam asetat : ammonia (10:4:5) sebanyak 10 ml dimasukan dalam *chamber* dan dijenuhkan dengan kertas saring. Penjenuhan selesai setelah eluen telah naik sampai atas kertas saring.

3) Identifikasi pada KLT

Sampel yang telah disiapkan ditotolkan sebanyak 20 μ l, 1 cm dari bawah dengan menggunakan *Syringe* tiap sampel dan baku pembanding diberi jarak 1 cm dari tiap pentolan. Plat yang telah ditotolkan, dimasukan dalam chamber yang telah dijenuhkan dan ditutup kemudian didiamkan sampai eluen naik ke batas atas plat. Setelah itu amati dibawah sinar UV 254 nm dan dihitung nilai Rf-nya.

E. Skema Kerja



Gambar 1. Skema Kerja

BAB III

METODE PENELITIAN

F. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental laboratorik yaitu dengan melakukan observasi pada saus yang diduga mengandung Rhodamin B dan dilakukan analisis secara kualitatif dan kuantitatif di laboratorium.

Penelitian ini mengambil sampel saus di pasar Gamping Kabupaten Sleman dengan kriteria inklusi saus tidak terdaftar pada Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM).

G. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Waktu penelitian dimulai dari bulan Oktober 2017 sampai Februari 2018, tahap pada penelitian ini meliputi tahap persiapan, pelaksanaan, dan tahap penyelesaian

H. Instrumen Penelitian

3. Alat

Timbangan Analitik (Mettler Tolloedo®), Hot Plate (Cimarec®), Membran Filter 0,45 µm (Whatman no 42®), Corong Buchner, Corong Pisah, Pipet Volume Erlenmeyer 250 ml Gelas Kimia, Labu Ukur, Spektrofotometri Uv-Vis Double Beam (Jasco V-730®), Syringe (Hamilton®), Camber KLT (Camag®).

4. Bahan

Rhodamin B, Saus A (Prima Sari), Saus B (Niki Harum), Saus C (Tidak Bermerk), aquadest, ammonia, Etanol, NaOH, Dietileter, HCl, asam asetat, n-Butanol, Lempeng KLT silica gel GF 254, Benang Wol.

I. Cara Kerja

3. Metode Spektrofotometri Uv-Vis

Analisis Rhodamin B bisa dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis (BPOM, 2006). Metode analisis menggunakan Spektrofotometri berdasarkan penelitian dari Putri (2009) yang dimodifikasi :

d. Pembuatan Larutan Baku

Menimbang larutan 100 mg dan dilarutkan dalam 0,1 liter HCl 0,1 N dan didapat konsentrasi 1000 ppm kemudian diencerkan dan dibuat enam seri kadar dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6, 7 ppm.

e. Pembuatan Larutan Sampel

Pembuatan larutan sampel dengan cara menimbang lima gram saus dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml. Larutan kemudian ditambahkan 100 ml yang terdiri dari amonia 2% dalam etanol 70%, larutan didiamkan selama 1 hari. Larutan kemudian disaring menggunakan *Whatman* no. 42 dan diuapkan selama 4 jam sampai pekat.

Larutan kemudian ditambahkan aquades 30 ml dan diaduk, dimasukkan dalam corong pisah 250 ml dan ditambahkan 6 ml natrium hidroksida 10 %, kemudian diekstraksi dengan 30 ml dietileter dan digojok sampai membentuk 2 lapisan yaitu lapisan eter jernih (dibagian atas) dan air merah (dibagian bawah), pisahkan hingga hanya tersisa ekstrak eter. Ekstrak eter kemudian dicuci dengan larutan natrium hidroksida 0,5% sebanyak 5 ml, larutan digojok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan eter (atas) dan larutan berwarna coklat (bawah).

Larutan yang berwarna coklat dipisahkan hingga hanya ekstrak eter dan diekstraksi 3 kali dengan 10 ml asam klorida 0,1 N hingga lapisan eter tidak berwarna lagi, ekstrak asam klorida ditampung dalam labu takar 50 ml dan ditambahkan HCl sampai dengan volume 50 ml. Larutan baku dan larutan sampel diukur dengan spektrofotometri UV-Vis *double beam* dengan panjang gelombang 450 nm – 700 nm.

f. Identifikasi dengan Spektrofotometri

3) Pembuatan kurva baku

Seri kadar Rhodamin B diukur panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometri UV-Vis, kemudian seri kadar dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6, 7 ppm masing masing diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal, kemudian akan diperoleh kurva konsentrasi, sebagai blanko digunakan HCl 0,1 N

4) Penetapan Kadar Rhodamin B

Sampel yang telah disiapkan diukur serapannya pada panjang gelombang 557 nm, dan dihitung kadar Rhodamin B dalam sampel dengan kurva kalibrasi persamaan regresi : $y = ax+b$

Perhitungan kadar Rhodamin B menggunakan rumus :

$$K = \frac{X \cdot V \cdot Fp}{Bs}$$

Keterangan :

- K = Kadar Rhodamin B dalam sampel (mcq/g)
- X = Kadar Rhodamin B setelah pengenceran
- V = Volume sampel (ml)
- Fp = Faktor pengenceran
- Bs = Berat sampel

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prinsip kerja KLT didasarkan pada perbedaan kepolaran sampel, analisis Rhodamin B menggunakan KLT dilihat dengan membandingkan nilai Rf baku dengan sampel, dan saat dilihat secara visual bewarna merah jambu, kemudian saat dilihat dibawah lampu UV 254 nm berflourosensi kuning atau oranye. Identifikasi sampel menggunakan Plat KLT GF 254 dengan fase gerak berupa n-Butanol : asam asetat : ammonia (10:4:5).

Prosedur Analisis berdasarkan penelitian berdasarkan penelitian dari Utami dan Suhendi (2009) :

d. Pembuatan Larutan Baku Pembanding

Pembuatan larutan baku pembanding dibuat dengan menimbang 100 mg Rhodamin B dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest

e. Pembuatan Sampel

Memimbang sepuluh gram saus dan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 100 ml yang terdiri dari amonia 2% dalam etanol 70%, larutan didiamkan selama 1 hari. larutan didiamkan selama 1 hari. Larutan kemudian disaring menggunakan *whatman* no 42 dan dipanaskan diatas hot plate. Residu penguapan ditambahkan 10 ml aquades dan 5 ml asetat 5 %. Memasukan benang wol dengan ukuran 15 cm kedalam larutan dan didihkan larutan tersebut sehingga pewarna akan terikat dengan benang wol, angkat benang wol dan larutkan dalam 10 ml larutan amonia 10 % (dalam etanol 70%) dan dipanaskan hingga warna benang wol luntur. Larutan tersebut digunakan sebagai sampel pada analisa KLT.

f. Identifikasi Sampel dengan KLT

4) Plat KLT GF 254

Panaskan plat GF 254 dengan ukuran 4 x 10 cm diatas hot plate dengan suhu 110 °C selama 15 menit, setelah itu beri tanda 1 cm diatas dan 1 cm dibawah dengan pensil.

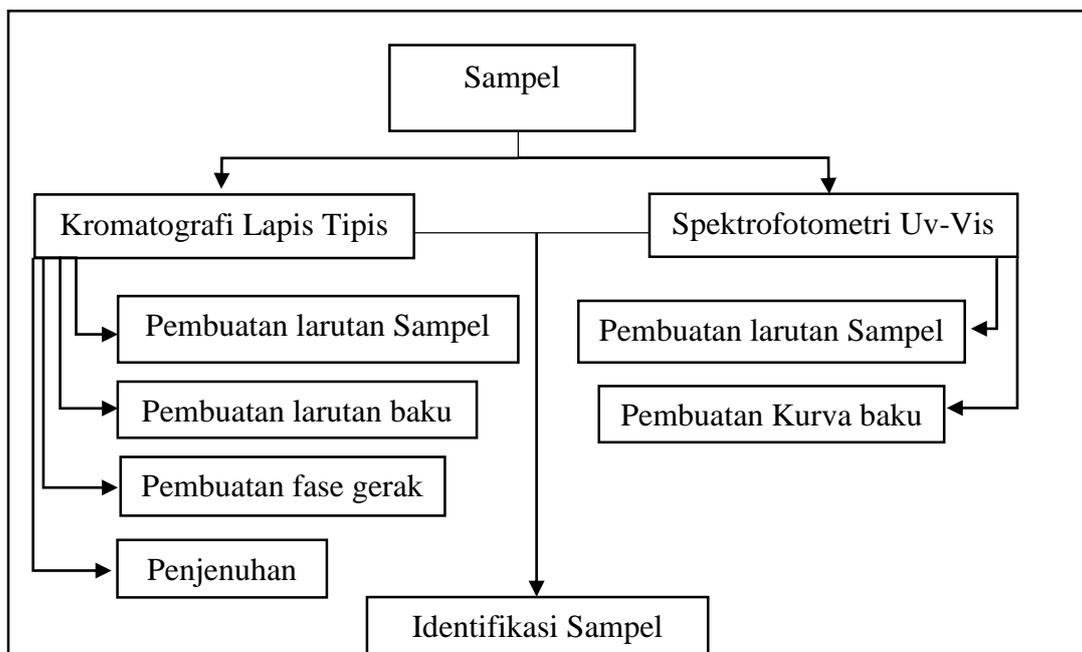
5) Penjenuhan

Fase gerak berupa n-Butanol : asam asetat : ammonia (10:4:5) sebanyak 10 ml dimasukan dalam *chamber* dan dijenuhkan dengan kertas saring. Penjenuhan selesai setelah eluen telah naik sampai atas kertas saring.

6) Identifikasi pada KLT

Sampel yang telah disiapkan ditotolkan sebanyak 20 μ l, 1 cm dari bawah dengan menggunakan *Syringe* tiap sampel dan baku pembanding diberi jarak 1 cm dari tiap pentolan. Plat yang telah ditotolkan, dimasukan dalam *chamber* yang telah dijenuhkan dan ditutup kemudian didiamkan sampai eluen naik ke batas atas plat. Setelah itu amati dibawah sinar UV 254 nm dan dihitung nilai Rf-nya.

J. Skema Kerja



Gambar 2. Skema Kerja

