

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ikan Nila Merah segar diambil dari keramba yang berada di perairan Waduk Kedungombo.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dari penelitian ini adalah ikan nila merah segar berukuran sedang dengan berat kurang lebih 250 – 350 gram sampel diambil dari keramba yang berada di Waduk Kedungombo bagian hulu dan hilir pada bulan Mei 2019.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar logam berat timbal (Pb) pada ikan nila merah secara spektrofotometri serapan atom.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama diklasifikasikan kedalam berbagai variabel, antara lain : variabel bebas, variabel kendali, variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini

adalah ikan nila merah yang berada di keramba Waduk Kedungombo Kabupaten Grobogan.

Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah pelarut, berat penimbangan sampel, destruksi, spektrofotometri serapan atom, dan kondisi penelitian.

Variabel tergantung adalah pusat atau titik permasalahan yang merupakan pemilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar logam berat timbal (Pb) dalam ikan nila merah.

### **3. Definisi operasional variabel penelitian**

Pertama, ikan nila merah (*Oreochromis niloticus*) merupakan hasil hibridisasi antara ikan nila betina *reddish-orange mossambique* (*Oreochromis mossambicus*) dengan ikan nila jantan normal (*Oreochromis niloticus*) hal ini mematahkan dugaan bahwa nila merah merupakan ikan yang mengalami penyimpangan genetik karena warna tubuhnya albino.

Kedua, kadar timbal adalah banyaknya jumlah timbal yang terdapat pada daging ikan nila merah yang dianalisis. Batas maksimum kadar timbal pada ikan berdasarkan SNI 2729:2013 adalah sebesar 0,3 mg/kg.

Ketiga, spektrofotometri serapan atom adalah suatu metode analisis untuk menentukan konsentrasi suatu unsur dalam suatu cuplikan yang didasarkan pada proses penyerapan radiasi oleh atom-atom yang berada pada tingkat energi dasar (*ground state*), menggunakan metode spektrofotometri serapan atom larutan sampel berada dalam suasana asam, hal ini dapat dilakukan dengan cara destruksi.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu takar 25 mL, 100 mL, batang pengaduk, pisau, penggiling ikan, corong kaca, kertas saring *whatman* no. 42, neraca analitik, pipet tetes, pipet volume, *beaker glass*, *hotplate*, spektrofotometri serapan atom, pH meter, tabung reaksi dan rak tabung reaksi.

### 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daging ikan nila merah, larutan standar  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  1000 ppm, larutan aquadest asam 0,5 % (95 mL Aquadest dan 0,5 mL  $\text{HNO}_3$  pekat), larutan  $\text{HNO}_3$  65 %, larutan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aquabidest, serbuk  $\text{NH}_4\text{OH}$ , kristal KCN, larutan ditizon 0,005 %, serbuk KI, dan serbuk  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel ikan nila dalam penelitian ini adalah diperoleh langsung dari keramba yang berbeda di perairan Waduk Kedungombo, sampel 1 dari keramba bagian hulu dan sampel 2 dari keramba bagian hilir.

### 2. Pembuatan larutan standar timbal (Pb)

**2.1 Pembuatan larutan baku timbal (Pb) 100 ppm.** Larutan standar timbal (Pb) 1000 ppm dipipet 10 mL dan dimasukkan kedalam labu takar 100 mL, kemudian ditambahkan larutan aquadest asam 0,5 % hingga garis tanda lalu dihomogenkan.

**2.2 Pembuatan kurva kalibrasi.** Dari Larutan  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  100 ppm dibuat seri dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ppm, masing-masing volume pipet dimasukkan kedalam labu takar 100 mL ditambahkan larutan aquadest asam 0,5 % hingga garis tanda lalu homogenkan dan diukur serapannya dengan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 217 nm, catat nilai absorbansi yang diperoleh.

### 3. Preparasi sampel

Sampel ikan nila merah dibersihkan dari sisik-sisiknya, lalu isi perut beserta insangnya dikeluarkan, kemudian dicuci dengan air sampai bersih. Daging ikan yang telah dibersihkan kemudian dipisahkan dari tulangnya, dan dihaluskan dengan penggiling ikan, sampel ditimbang sebanyak 10 gram dalam beaker glass 100 mL, dilakukan metode destruksi basah yaitu ditambah 10 mL larutan  $\text{HNO}_3$  65 % serta 2 mL larutan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan dipanaskan dengan *hotplate* sampai mendidih (proses dilakukan sampai asap berwarna coklat hilang, karena asap berwarna coklat tersebut akan mempengaruhi absorbansi sampel, dan terjadi endapan pada larutan sampel, meskipun telah disaring dengan kertas saring *whatman* no. 42 ), destruksi dihentikan jika larutan sudah jernih, larutan didiamkan sampai dingin, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL, ditambah dengan aquabidest sampai garis tanda, larutan dihomogenkan lalu disaring dengan kertas saring *whatman* no. 42 dan dimasukkan kedalam vial.

### 4. Validasi metode

**4.1 Linearitas.** Pengujian linearitas baku  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  dengan membuat seri konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ppm, masing-masing volume pipet

dimasukkan kedalam labu takar 100 mL ditambahkan larutan aquadest asam 0,5 % hingga garis tanda lalu homogenkan, larutan seri konsentrasi tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 217 nm, nilai absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan  $y = a + b x$ . Kurva kalibrasi digunakan untuk menentukan nilai korelasi.

**4.2 Akurasi.** Dibuat larutan dengan konsentrasi 0,1; 0,3; 0,5 ppm dari larutan baku  $Pb(NO_3)_2$  100 ppm dalam labu takar 100 mL dengan pelarut aquades asam 0,5 % , setiap konsentrasi masing-masing dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 217 nm, nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung prosentase *recovery*.

**4.3 Presisi.** Dibuat larutan dengan konsentrasi 0,2 ppm dari larutan baku  $Pb(NO_3)_2$  100 ppm dalam labu takar 100 mL dengan pelarut aquadest asam 0,5 % pengukuran dilakukan sebanyak 10 kali diukur serapannya dengan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 217 nm, nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan koefisien varians.

**4.4 Selektivitas.** Pengujian selektivitas yaitu dilakukan uji kualitatif pada sampel dengan menggunakan metode spektrofotometri serapan atom.

**4.5 LOD dan LOQ.** Pengujian LOD dan LOQ dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

## 5. Analisis sampel

**5.1 Uji kualitatif.** Uji kualitatif pada penelitian dilakukan dengan uji ditizon (Pereaksi KCN + larutan ditizon 0,005 %) serta dengan penambahan

serbuk KI dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pada larutan sampel kemudian dilakukan juga dengan menggunakan metode spektrofotometri serapan.

**5.2 Uji kuantitatif.** Larutan hasil preparasi sampel dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL kemudian ditambah dengan aquabidest sampai garis tanda, dihomogenkan dan diukur serapannya dengan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 217 nm, nilai absorbansi yang didapatkan untuk menentukan kadar sampel dalam satuan mg/kg.

## E. Analisis Hasil Pengukuran

### 1. Preparasi sampel

Hasil preparasi sampel yang dilakukan akan menghasilkan larutan jernih, lalu sampel diukur serapannya dengan spektrofotometri serapan atom pada panjang gelombang 217 nm..

### 2. Pembuatan kurva baku timbal (Pb)

Nilai kurva baku didapat dengan membuat persamaan regresi linear antara nilai absorbansi yang didapat dari tiap seri konsentrasi yang dibuat dengan konsentrasi baku, sehingga didapat persamaan  $y = a+bx$ .

### 3. Validasi metode

**3.1 Linearitas.** Linearitas dihitung menggunakan persamaan regresi linear  $y = a+bx$ . Metode analisis yang baik adalah ketika linearitas metode mendapatkan korelasi (R) 0,999.

**3.2 Akurasi.** Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*), prosentasi *recovery* harus diantara 80% - 120%.

**3.3 Presisi.** Presisi diukur dengan menentukan koefisiens varians, presisi yang baik adalah ketika nilai koefisiensi varian atau simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%

**3.4 Selektivitas.** Selektivitas diukur pada uji kualitatif sampel dengan menggunakan spektrofotometri serapan atom, apabila lampu katoda timbal memberikan nilai serapan sampel dinyatakan positif mengandung timbal.

**3.5 LOD dan LOQ.** LOD adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko, sedangkan LOQ adalah parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

#### **4. Penentuan kadar sampel**

Penentuan kandungan timbal pada sampel yang telah dipreparasi dilakukan pengukuran serapan dengan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 217 nm. Nilai absorbansi yang didapatkan disubstitusikan ke dalam persamaan  $y = a + b x$ , dimana  $y$  adalah absorbansi sampel,  $a$  adalah intersept,  $b$  adalah slope dan  $x$  adalah konsentrasi, kemudian nilai konsentrasi ( $x$ ) yang didapatkan digunakan untuk menghitung kadar timbal (Pb) dalam satuan mg/kg.

Rumus perhitungan kadar timbal (Pb):

$$\text{Kadar Pb mg/kg} = \frac{C (\text{mg/L}) \times V (\text{L})}{B (\text{kg})}$$

Dimana :

C = Konsentrasi sampel (Nilai X); V = Volume sampel (L); B = Berat sampel (kg)