

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan keseluruhan alam semesta perdebatan yang merupakan generalisasi hasil penelitian. Populasi pada penelitian ini yaitu menggunakan susu sapi murni yang beredar di daerah Gladagsari, Boyolali.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian dari populasi yang menjadi subjek penelitian. Sebanyak 3 sampel diambil secara acak dari KUD susu yang ada di daerah Gladagsari, Boyolali yaitu sampel A, sampel B, dan sampel C.

2.1 Kriteria Inklusi. Sampel susu sapi murni yang berada di KUD susu desa Kembang, Gladagsari, Boyolali.

2.2 Kriteria Eksklusi. Sampel susu sapi murni yang digunakan dalam kondisi baik dan belum basi.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel dalam penelitian ini, khususnya kandungan kalsium pada susu sapi murni. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah kondisi eksperimen dan peralatan eksperimen. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan kalsium sampel.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Sampel susu murni diambil dari peternak sapi perah di wilayah Boyolali dengan pengambilan secara acak atau random sampling sejumlah 3 sampel. Identifikasi kadar kalsium (Ca) dalam sampel susu sapi murni dilakukan dengan metode kualitatif dan kuantitatif menggunakan instrument spektrofotometri serapan atom (SSA). Penelitian ini dilakukan salah satunya untuk menambah wawasan masyarakat terkait kadar kalsium (Ca) pada susu sapi murni yang berada disekitar.

3. Definisi Operasional Variabel

Kalsium merupakan mineral terpenting yang dibutuhkan manusia, terdapat pada sumber kalsium dari tumbuhan dan hewan. Susu adalah cairan berwarna putih yang disekresikan oleh kelenjar susu

pada mamalia betina yang merupakan sumber energi dan makanan dengan nilai gizi yang tinggi. Susu sapi murni adalah susu yang dikeluarkan oleh sapi perah. Spektrofotometri Serapan Atom (AAS) adalah suatu metode analisis yang didasarkan pada proses penyerapan energi radiasi oleh atom-atom yang berada pada tingkat energi dasar (ground state).

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel susu murni dari daerah Gladagsari, Boyolali, baku kalsium, HCl 0,1 N, Na_2S , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, asam nitrat p.a HNO_3 Pekat (65%), lanthanum klorida (LaCl_3), dan aquadest demerilisata.

2. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer serapan atom (SSA), hot plate, Gelas ukur (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), labu takar 1000 mL (Pyrex), labu takar 100 mL (Pyrex), labu takar 25 mL (Pyrex), pipet volume, vial 25 mL, pipet tetes, corong kaca, pomp pipet, kertas saring whatman 42.

D. Jalannya Penelitian

1. Teknik Sampling dan Proses Sampling

1.1 Teknik Sampling. Teknik pengambilan sampel yang dipakai oleh peneliti adalah metode simple random sampling, dan proses pengambilan sampel dilakukan dengan diberikan kesempatan yang sama kepada setiap anggota populasi untuk menjadi bagian dari cuplikan. Cuplikan yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah sampel susu murni yang beredar di wilayah Gladagsari, Boyolali.

1.2 Proses Sampling. Pengambilan sampel pada susu sapi murni dilakukan berdasar cara pemberian makan serta perbedaan kondisi lingkungan pada sapi yang berada di daerah Gladagsari, Boyolali. Dalam hal ini pengambilan sampel diambil sebanyak 3 sampel susu sapi murni untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini yaitu sampel A, sampel B, dan sampel C.

2. Prosedur Kerja Analisis Kualitatif

2.1 Uji kualitatif menggunakan spektrofotometer serapan atom. Pada penelitian kali ini menggunakan Hollow Cathode Lamp khusus kalsium menggunakan nyala. Jika terdapat serapan maka

menunjukkan adanya logam yang dianalisis dalam sampel tersebut. Alat SSA dengan Hollow Cathode Lamp khusus kalsium, kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum 400-700 nm.

2.2 Uji kualitatif menggunakan pereaksi warna. Sampel susu sapi murni diambil sebanyak 1 mL pada tiap-tiap sampel susu sapi A, B, C kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL HCl 0,1 N dan 6 tetes Na_2S (Suryandari, 2012). Terbentuknya endapan putih menunjukkan bahwa sampel mengandung kalsium. Kedua, sampel susu sapi murni diambil sebanyak 1 mL pada tiap-tiap sampel susu sapi A, B, C kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambah 8 tetes ammonium karbonat $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ akan terbentuk endapan putih kalsium karbonat (CaCO_3) (Purnama *et al*, 2017).

3. Prosedur Kerja Analisis Kuantitatif

3.1 Preparasi Sampel. Diambil 50 mg cuplikan susu murni masukkan dalam Erlenmeyer yang berukuran 250 mL kemudian ditambah 50 mL asam nitrat pekat (HNO_3 65%), lalu proses destruksi dilakukan diatas hot plate dengan suhu 280°C dan pada lemari asam atau ruangan keadaan tertutup selama 22 menit 57 detik atau sampai larutan berubah warna menjadi kuning muda jernih. Hasil yang didapat setelah didestruksi dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Ditambah dengan aquades demiralisata hingga volumenya mencapai garis dan dikocok sampai homogen. Penyaringan dilakukan dengan menggunakan kertas saring, filtrate pertama sekitar 10% dibuang kemudian untuk filtrate selanjutnya ditampung dalam botol atau wadah (Sinaga, 2020).

3.2 Pembuatan Larutan Baku Kalsium. Dipipet sebanyak 10 mL larutan standar kalsium 1000 mg/L dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan dicukupkan dengan menggunakan larutan pengencer hingga garis tanda sehingga didapatkan konsentrasi 100 mg/L.

3.3 Penetapan Kurva Baku. Dari larutan baku 100 mg/L dipipet masing-masing 2 mL; 4 mL; 8 mL; 16 mL; dan 32 mL dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL (larutan kerja memiliki konsentrasi 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; dan 32 mg/L, masing-masing konsentrasi ditambahkan dengan 1 mL Lantanum klorida (LaCl_3) dan dicukupkan menggunakan larutan pengencer hingga tanda batas kemudian kocok hingga homogen, masing masing konsentrasi lalu diukur menggunakan alat AAS pada panjang gelombang 422,7 nm.

Dibaca absorbansinya untuk menentukan persamaan regresi linier $y = bx + a$ (Sinaga, 2020).

3.4 Penetapan Kadar Kalsium Susu Sapi. Larutan cuplikan hasil destruksi diambil sebanyak 10 mL ditambah dengan dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambah 1 mL Lantanum klorida (LaCl_3) dicukupkan dengan pelarut sampai garis tanda. Sampel A, B, dan C langsung dilakukan pengukuran. Sampel diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri serapan atom yang telah dikondisikan dan diatur metodenya dimana penetapan kadar kalsium dilakukan pada panjang gelombang 422,7 nm dengan nyala udara-asetilen (Sinaga, 2020).

4. Validasi Metode

4.1 Linieritas. Uji ini dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi standar diambil 6 seri konsentrasi kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer serapan atom (SSA). Setelah itu didapatkan harga koefisien korelasi (r). Nilai keberterimaannya jika mendekati 0,999.

4.2 Akurasi. Uji ini dilakukan dengan mengambil 3 macam seri konsentrasi yang masing masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak 3x.

4.3 LOD (*Limit of Detection*). Perhitungan LOD dilakukan dengan memasukkan data absorbansi larutan standar baku kedalam persamaan regresi linier yang diperoleh.

4.4 LOQ (*Limit of Quantification*). Perhitungan LOQ dilakukan dengan memasukkan data absorbansi larutan standar baku kedalam persamaan regresi linier yang diperoleh.

4.5 Presisi. Uji ini dilakukan dengan membuat larutan baku dengan konsentrasi tertentu kemudian diukur absorbannya larutan baku pada panjang gelombang maksimum sebanyak 10 kali pengulangan dengan spektrofotometri serapan atom, sehingga memperoleh nilai SD dan RSD.

4.6 Sensitivitas. Sensitivitas kurva kalibrasi dapat dinyatakan sebagai nilai kemiringan atau *slope* (b) dari kurva kalibrasi larutan. *Slope* adalah nilai kemiringan grafik antara absorbansi dan konsentrasi.

4.7 Range. Berbagai metode yang diuji dengan melakukan verifikasi data menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas yang dapat diterima, baik pada konsentrasi terendah dan tertinggi maupun pada konsentrasi lain, hingga batas yang sesuai.

E. Analisis Hasil

1. Uji Kualitatif Kalsium

Uji kualitatif menggunakan spektrofotometer serapan atom. Analisis dilakukan dengan mengamati ada atau tidaknya serapan dalam sampel. Uji kalsium dengan asam nitrat 1 N (Vogel, 1985). Jika terdapat serapan maka menunjukkan adanya logam yang dianalisis dalam sampel tersebut. Disiapkan alat spektrofotometri serapan atom dengan menggunakan Hollow Cathode Lamp khusus kalsium dengan uji nyala, kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum 400-700 nm.

Senyawa kalsium jika ditambah 1 mL HCl 0,1 N dan 1 mL Na₂S akan terbentuk endapan putih menunjukkan bahwa sampel positif mengandung kalsium (Suryandari, 2012). Senyawa kalsium ditambahkan ammonium karbonat (NH₄)₂CO₃ terbentuk endapan putih kalsium karbonat (CaCO₃) menunjukkan bahwa sampel positif mengandung kalsium (Purnama, R. C., *et al* (2017).

2. Uji Kuantitatif

Penetapan kadar kalsium pada 3 sampel susu murni yang diberi label A, B, dan C menggunakan spektrofotometri serapan atom (SSA). Pada pengukuran panjang gelombang maksimum logam Ca memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 422,7 nm.

2.1 Membuat persamaan regresi Linier. Regresi linier merupakan hubungan antara konsentrasi (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y). Regresi linier dibuat dengan rumus : $y = bx + a$

Keterangan :

a = Intercept

b = Slope

y = Serapan yang diperoleh

x = Konsentrasi

Persamaan regresi linier digunakan untuk perhitungan konsentrasi kalsium yang terdapat dalam sampel. Nilai r yang baik adalah yang mendekati angka 1, karena nilai r digunakan sebagai patokan ke linieritas dari kurva baku (Ramadhani *et al.*, 2018).

2.2 Perhitungan Kadar kalsium. Perhitungan kadar Ca dalam larutan sampel dapat ditentukan dengan rumus :

$$\text{Kadar Logam } (\mu\text{g/mL}) = \frac{C_x V_x \text{FP}}{\text{BS}}$$

Keterangan :

C = konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)

V = volume larutan sampel (ml)

FP = factor pengenceran

BS = berat sampel (g)

3. Validasi Metode

3.1 Linieritas. Hukum *Lambert-Beer* mengatakan bahwa absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi, maka nilai koefisien korelasi dapat diterima jika nilainya $\geq 0,999$ (Irnawati, 2016), karena menunjukkan hubungan linier antara absorbansi terukur dengan konsentrasi dari analit. Penetapan linieritas menurut rekomendasi ICH yaitu minimal menggunakan 5 konsentrasi (Farmakope Indonesia edisi VI, 2020)

3.2 Akurasi. Akurasi adalah ketepatan metode analisis atau seberapa dekat nilai yang diukur dengan nilai yang diterima, yang dapat berupa nilai konvensional, nilai aktual, atau nilai referensi. Akurasi diukur dengan jumlah analit yang diperoleh kembali selama pengukuran dengan doping sampel (Gandjar dan Rohman, 2014). Akurasi dapat dilihat dari *% recovery* atau persen perolehan kembali dari penetapan analit, dimana syarat akurasi yang baik adalah antara 98-101,0% (Irnawati, 2016).

3.3 Presisi. Presisi merupakan ukuran kedekatan hasil analisis diperoleh dari serangkaian pengukuran ulangan dari ukuran yang sama. Hal ini digunakan untuk melihat kesalahan acak yang terjadi dalam sebuah metode. Presisi dapat dilihat sebagai koefisien variasi atau standar deviasi relatif dari hasil analisis yang diperoleh dari standar kontrol kualitas yang disiapkan secara independen. (Riyanto, 2014). Hasil pengukuran akan diperoleh nilai SD (*Standar Deviasi*) dan RSD (*Relative Standar Deviasi*), dimana yang dipersyaratkan untuk presisi adalah $< 1\%$ (Irnawati, 2016)

3.4 Limit of Detection (LOD). *Limit of Detection* (LOD) adalah karakteristik pemeriksaan batas. Ini adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi, tetapi tidak diukur, di bawah kondisi eksperimental yang ditentukan. Uji batas hanya mengkonfirmasi bahwa konsentrasi analit di bawah atau di atas tingkat tertentu. Batas deteksi biasanya dinyatakan sebagai konsentrasi analit dalam sampel (FI Ed. VI).

3.5 Limit of Quantification (LOQ). *Limit of Quantification* (LOQ) adalah properti untuk penentuan kuantitatif senyawa tingkat rendah dalam matriks. Batas kuantifikasi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima di bawah kondisi eksperimental yang

ditentukan. Batas kuantifikasi dinyatakan sebagai konsentrasi analit dalam sampel (FI Ed. VI).

3.6 Sensitivitas. Sensitivitas dapat dinyatakan sebagai kemiringan kurva. Pada penelitian ini sensitivitas dinyatakan sebagai nilai kemiringan kurva kalibrasi yang diperoleh pada selang waktu tertentu. Sensitivitas datum menunjukkan bahwa setiap perubahan satuan konsentrasi akan mengakibatkan perubahan absorbansi nilai kemiringan tertentu. (Skoog, 1985).

3.7 Range. Rentang adalah interval antara batas bawah dan batas atas konsentrasi analit yang ditunjukkan dengan hasil yang dapat diterima dalam hal presisi, akurasi, dan linieritas.