

BAB III METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini mengadopsi pendekatan eksperimental dengan fokus utama pada pengembangan metode dan penetapan kadar zat pewarna, yaitu *Yellow FCF*, *Allura*, *Methanil Yellow*, dan *Tartrazine*, secara simultan pada makanan dan minuman yang beredar di supermarket. Penelitian ini akan melibatkan serangkaian tahap yang terstruktur. Langkah awal yaitu membuat simultan campuran dari keempat zat pewarna. Selanjutnya dilakukan optimasi terhadap fase gerak yang akan digunakan. Setelah didapat kondisi fase gerak yang optimum, dilakukan validasi metode analisis yang meliputi selektifitas, akurasi, presisi, linieritas, LOD, dan LOQ. Parameter yang sudah memenuhi persyaratan validasi digunakan untuk menetapkan kadar *yellow fcf*, *red allura*, *methanil* dan *tartazin*.

B. Subyek Penelitian

Penelitian ini fokus pada penetapan kadar zat pewarna *yellow FCF*, *allura* *Methanil*, dan *tartazine*. Subyek penelitian ini adalah beragam jenis makanan dan minuman yang ditawarkan kepada konsumen di Supermarket sebagai sampel yang akan diuji menggunakan metode HPLC .

C. Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari standar baku *Yellow FCF*, *Red Allura*, *Metanil Yellow*, dan *Tartrazine*, serta sampel makanan dan minuman yang tersedia di Supermarket secara acak.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Independen

Variabel independen adalah variabel yang diubah atau dikendalikan dalam penelitian untuk melihat pengaruhnya terhadap variabel dependen. Dalam penelitian ini variabel independen yaitu panjang gelombang, pH, fase gerak, dan laju alir.

2. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah variabel yang diukur atau diamati dalam penelitian yang diharapkan berubahannya sebagai respon terhadap variabel independen. Variabel dependen pada penelitian ini yaitu, kadar zat pewarna *yellow* FCF, *allura*, *metanil* dan *tartazine* dengan waktu retensi, dan resolusi.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang tetap konstan dan tidak diubah selama penelitian. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa pengaruh yang diukur yakni variabel dependen hanya disebabkan oleh variabel independen. Dalam penelitian ini variabel terkontrolnya yaitu detektor yang digunakan pada penetapan kadar zat pewarna, dan teknik injeksi.

4. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Sampel makanan diambil satu kali (tidak melakukan pengulangan) di Supermarket atau grosiran yang tersebar di kota Solo dengan cara mendata merek dan komposisi zat pewarna yang digunakan.

Kedua, preparasi sampel makanan dan sampel minuman dan pembuatan larutan standar.

Ketiga, Sampel yang telah dilakukan preparasi kemudian dilakukan pengujian menggunakan HPLC di laboratorium UII.

Keempat, Hasil penetapan kadar, yang digunakan dalam analisis menggunakan HPLC untuk menentukan kadar *yellow* fcf, *allura*, *metanil* *yellow*, dan *tartazin* adalah nilai konsentrasi atau jumlah substansi dalam sampel.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *beaker glass* (Pyrex Iwaki), tabung *ependorf*, spatula, labu ukur (Oberoi) 10, 25, 50, 100, 500, 1000 mL, timbangan analitik (Boeco), *column eclipse plus* C-18 5 μ m (150 x 4,6 mm), pipet mikro dan tube (Oberoi), penyaring syringe politetrafluoro etilena (PTFE) 0,45 μ m HPLC Knauer detektor UV (*autosampler*).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu standar zat pewarna *Yellow* fcf, *Allura*, *Methanil Yellow* dan *Tartrazine*, aquadest

pro injeksi, asetonitril (Merck), ammonium fosfat pH 8.8 , asetonitril, sampel makanan dan minuman diperoleh dari supermarket.

F. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan larutan

1.1 Pembuatan Larutan buffer fosfat pH 5,6. Ditimbang 2,64 g amonium hidrogen ortofosfat dimasukan ke baker glass 250 mL. Setelah dilarutkan dengan aquabidest pro injeksi, dipindahkan ke labu ukur 1 L. Diukur pH buffer fosfat terlebih dahulu, jika nilai pH belum memenuhi kriteria maka perlu ditambahkan asam atau basa disesuaikan dengan pH buffer fosfat yang diinginkan. Saring dengan filter 0,45 μ m dan disonasikan selama 30 menit.

1.2 Pembuatan larutan buffer fosfat pH 7,8. Ditimbang 2,64 g amonium hidrogen ortofosfat dimasukan ke baker glass 250 mL. Setelah dilarutkan dengan aquabidest pro injeksi, dipindahkan ke labu ukur 1 L. Diukur pH buffer fosfat terlebih dahulu, jika nilai pH belum memenuhi kriteria maka perlu ditambahkan asam atau basa disesuaikan dengan pH buffer fosfat yang diinginkan. Saring dengan filter 0,45 μ m dan disonasikan selama 30 menit.

1.3 Pembuatan larutan buffer fosfat 8,8. Ditimbang 2,64 g amonium hidrogen ortofosfat dimasukan ke baker glass 250 mL. Setelah dilarutkan dengan aquabidest pro injeksi, dipindahkan ke labu ukur 1 L. Diukur pH buffer fosfat terlebih dahulu, jika nilai pH belum memenuhi kriteria maka perlu ditambahkan asam atau basa disesuaikan dengan pH buffer fosfat yang diinginkan. Saring dengan filter 0,45 μ m dan disonasikan selama 30 menit.

2. Preparasi standar

2.1. Larutan Baku Induk *Yellow FCF*. Larutan baku induk *yellow fcf* ditimbang 10 mg kemudian dimasukan ke labu ukur 100 ml kemudian larutkan dan encerkan hingga tanda menggunakan aquabidest pro injeksi.

2.2. Larutan Baku Induk *Allura*. Larutan baku induk *Allura* di timbang 10 mg kemudian dimasukan ke labu 100 ml kemudian larutkan dan encerkan hingga tanda menggunakan aquabidest pro injeksi.

2.3. Larutan Baku Induk *Methanil Yellow*. Larutan baku induk *methanil* ditimbang 10 mg kemudian masukan ke labu 100 ml

kemudian larutkan dan encerkan hingga tanda menggunakan aquabidest pro injeksi.

2.4. Larutan Baku Induk *Tartazine*. Larutan baku induk tartazine ditimbang 10 mg masukan kelabu ukuran 100 ml lalu dilarutkan dan encerkan hingga tanda menggunakan aquabidest pro injeksi.

2.5. Pembuatan Larutan Baku Campuran. Larutan pewarna masing- masing 0,3 ml *Yellow fcf*, 0,3 ml Allura, 0,5 ml Methanil *yellow* dan 0,3 ml Tartazine masukan kedalam labu 10 ml. Kemudian diencerkan dengan campuran buffer Ammonium fosfat dan asetonitril (5:5) sampai batas tanda.

2.6. Pembuatan Kurva Kalibrasi. Konsentrasi standar kalibrasi 0,3; 0,5; 0,75; 1; 1,5 ; 1,25 ppm untuk *yellow fcf*, tartazine dan red allura. 0,5; 1; 1,25; 2; 3; 4 methanil dan dimasukan ke labu ukur 10 ml.

2.7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Tahap ini dilakukan untuk menentukan panjang gelombang yang akan digunakan pada detektor HPLC. Pengukuran absorbansi dilakukan pada larutan baku setiap senyawa dengan spektrofotometer UV-Vis pada 300-700 nm.

3. Optimasi Metode HPLC

3.1. Optimasi Panjang Gelombang. Tahap ini dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang optimum yang dihasilkan. Dilakukan penyaringan pada larutan baku campuran lalu disaring dan disonikasi selama 15 menit. Kemudian dimasukan ke vial HPLC lalu diinjeksi sebanyak 10 μ l larutan baku campuran ke dalam kolom dengan menggunakan laju alir 0,71 mL/ menit, suhu kolom 30°C, dengan komposisi Amonium fosfat dan asetonitril (5:5), pH fase gerak sekitar 8,8 dan panjang gelombang yang diuji 418- 508 nm. Selanjutnya dipilih kondisi yang terbaik yaitu pada panjang gelombang 508.

3.2. Optimasi pH fase gerak. Tahap ini dilakukan untuk memperoleh nilai pH larutan Amonium fosfat yang memberikan pemisahan senyawa dengan baik. Dilakukan penyaringan pada larutan baku campuran lalu disaring dan disonikasi selama 15 menit. Kemudian dimasukan ke vial HPLC lalu diinjeksi sebanyak 10 μ l larutan baku campuran ke dalam kolom dengan laju alir 0,71 mL/ menit, suhu kolom 30°C, dengan komposisi Amonium fosfat dan

asetonitril (5:5), pH fase gerak yang diuji 5,6 : 7,8 dan 8,8. Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan kondisi terbaik yaitu pada pH 8,8.

Parameter ini dilakukan untuk menetapkan parameter yang dipakai untuk menetapkan kondisi percobaan yaitu, waktu retensi, faktor kapasitas, faktor tailing, resolusi dan jumlah plat teoritis. Parameter resolusi (R) dalam HPLC bertujuan untuk mengukur seberapa baik dua puncak terpisah dalam sebuah kromatogram yang dapat dibedakan satu sama lain. Resolusi antara dua puncak dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_2 + W_1)}$$

Keterangan : R_s = Resolusi dari dua pita

$t_{R,1}$ = Waktu retensi senyawa pertama

$t_{R,2}$ = Waktu retensi senyawa kedua

W_1 = Luas area pita pertama

W_2 = Luas area pita kedua

3.3. Optimasi Perbandingan Fase Gerak. Tahap ini menentukan komposisi fase gerak yang optimum dan memberikan pemisahan senyawa yang baik. Dilakukan penyaringan pada larutan baku campuran lalu disaring dan disonikasi selama 15 menit. Kemudian dimasukan ke vial HPLC lalu diinjeksi sebanyak 10 μ l larutan baku campuran ke dalam kolom dengan kondisi optimasi laju alir 0,71 mL/ menit, suhu kolom 30°C, dengan komposisi Amonium fosfat dan asetonitril yang diuji (5:5, 8;2, 7;3).

3.4. Optimasi Laju Alir. Tahap ini menentukan laju alir optimum yang memberikan pemisahan senyawa yang baik. Dilakukan penyaringan pada larutan baku campuran lalu disaring dan disonikasi selama 15 menit. Kemudian dimasukan ke vial HPLC lalu diinjeksi sebanyak 10 μ l larutan baku campuran ke dalam kolom dengan menggunakan panjang gelombang 508 nm, perbandingan fase gerak (5:5) dan pH fase gerak 8,8 hasil optimasi dengan suhu kolom 30°C. Laju alir yang diuji adalah 0,71; 1,0 dan 1,2 mL/ menit. Setelah itu dipilih kondisi yang memberikan kondisi terbaik yaitu pada laju alir 0,71 mL/menit.

G. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan proses sistematis yang dilakukan untuk memastikan bahwa suatu metode analisis memberikan hasil yang akurat, andal, dan konsisten. Validasi diperlukan untuk memastikan bahwa suatu metode dapat digunakan dengan percaya diri untuk analisis sampel yang relevan. Beberapa parameter yang sering dievaluasi dalam validasi metode analisis meliputi:

1. Linieritas

Dari larutan induk masing- masing pewarna *yellow fcf*, *red allura*, *methanil*, dan *tartazin* dibuat berbagai macam konsentrasi. Masing- masing larutan disaring dengan saringan 0,45 µm kemudian di masukan ke vial HPLC dan HPLC akan menginjeksi 10 µl pada alat HPLC dengan kondisi terpilih. Kromatogram yang diperoleh dihitung koefisien relasi (r) melalui persamaan $y = a + bx$ antara koonsentrasi baku dengan area. Koefisien kolerasi (r) diterima apabila diperoleh nilai $r > 0,999$.

2. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Dibuat beberapa larutan konsentrasi dengan masing- masing larutan dengan membran filter 0,45 µm lalu kemudian di masukan ke vial HPLC dan HPLC akan menginjeksi sebanyak 10 µl pada HPLC dengan kondisi terpilih. Kromatogram yang diperoleh dihitung persamaan regresi antara kadar baku dengan area analit yang dinyatakan dengan persamaan ($y = a + bx$) dimana S adalah slope setelah itu ditentukan tinggi puncak analit. Nilai LOD dan LOQ dihitung menggunakan persamaan rumus sebagai berikut:

$$LOD = \frac{3SD}{b} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10SD}{b} \quad (3)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(Y - Y_i)^2}{n - 2}}$$

Keterangan :
 SD = Standar deviasi,
 Y = Luas area terdeteksi setiap konsentrasi
 Y_i = Luas area teoritis setiap konsentrasi,
 n = Jumlah ulangan penyuntikan sampel
 b = Slope persamaan regresi dari kurva kalibrasi.

3. Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku (standard addition method). Pengujian ini dilakukan

pada rentang 80%, 100%, dan 120%. Preparasi sampel dilakukan dengan cara sampel ditimbang kemudian ditambahkan aquabidest dan di homogenkan lalu disentrifugasi 2500 rpm selama 5 menit, lalu divortex selama 1 menit lalu disaring dengan penyaring berpori 0,45 um dan di masukan ke vial HPLC dan diinjeksi nginjeksi sekitar 10 µl dengan kondisi terpilih. Respon area dari kromatogram masing- masing sampel dimasukan kedalam persamaan kurva kalibrasi sehingga didapat kadarnya. Akurasi dinyatakan sebagai % recovery dari hasil sampel uji terhadap kadar analit sebenarnya yang ditambahkan dalam masing- masing sampel.

4. Presisi

Presisi dilaakukan dengan menyuntikan salah satu konsentrasi larutan baku *yellow*, *red allura*, methanil dan tartazin sebanyak 6 kali. Kromatogram yang dihasilkan dihitung koefisien variasi (KV) dari area baku dimana koefisien variasi tidak boleh lebih dari 2%. Presisi metode dilakukan dengan menghitung koefisien variasi (KV) dari kromatogram yang dihasilkan pada tahap akurasi. Presisi dianggap baik jika nilai $KV \leq 10\%$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$K_V = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan : SD = Standar deviasi,

Kv = Koefisien variasi,

X = Kadar rata-rata yang diperoleh dari percobaan.

5. Spesifitas

Dari larutan induk masing- masing pewarna *yellow fcf*, *red allura*, *methanil* dan *tartazin* di buat berbagai macam konsentrasi. Masing- masing larutan kemudian disaring dengan saringan 0,45 um kemudian di masukan ke vial HPLC dan HPLC akan menginjeksi 10 µl pada alat HPLC dengan kondisi terpilih. Kromatogram yang terpilih dihitung hasil resolusi (Rs), waktu retensi (tR), factor selektivitas dan jumlah N.

H. Penetapan Kadar Senyawa *yellow fcf*, *red allura*, *methanil* dan *tartazin* pada sampel

Sampel padatan (makanan ringan dan sejenisnya) yang telah dihomogenkan dengan blender ditimbang sekitar ± 3 gram, kemudian

dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge berukuran 15 mL. Setelah itu ditambahkan 10 mL larutan pereaksi ke dalam tabung dan homogenkan menggunakan alat vortex selama 1 menit. Tabung disonikasi selama 5 menit, dikocok manual selama 1 menit, dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Ambil lapisan jernih di bagian atas setelah disentrifugasi, pipet sebanyak yang dibutuhkan 1mL, dan masukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan disaring dengan penyaring syringe PTFE 0,45 μm dan ditaruh pada vial HPLC dan diinjeksikan sebanyak 10 μl ke alat HPLC dengan metode sesuai hasil optimasi. Perlakuan tersebut diulang sebanyak tiga kali ulangan. Persamaan regresi untuk setiap senyawa digunakan untuk menghitung kadarnya. Kadar dinyatakan dalam milligram per kilogram setiap senyawa dalam sampel dihitung dengan persamaan berikut:

$$M = \frac{c}{W} \times \frac{Fp}{1000} \times k$$

Kadar dinyatakan dalam persen massa per massa setiap senyawa dalam sampel dihitung dengan persamaan berikut (Wrolstad, et al., 2005):

$$P = \frac{M}{10^6} \times 100\%$$

Di mana: M = Kadar rata-rata BTM (mg/kg)

c = Kadar rata-rata BTM dari penyuntikan ($\mu\text{g/ml}$)

W = Massa rata-rata penimbangan sampel (kg)

Fp = Faktor Pengenceran

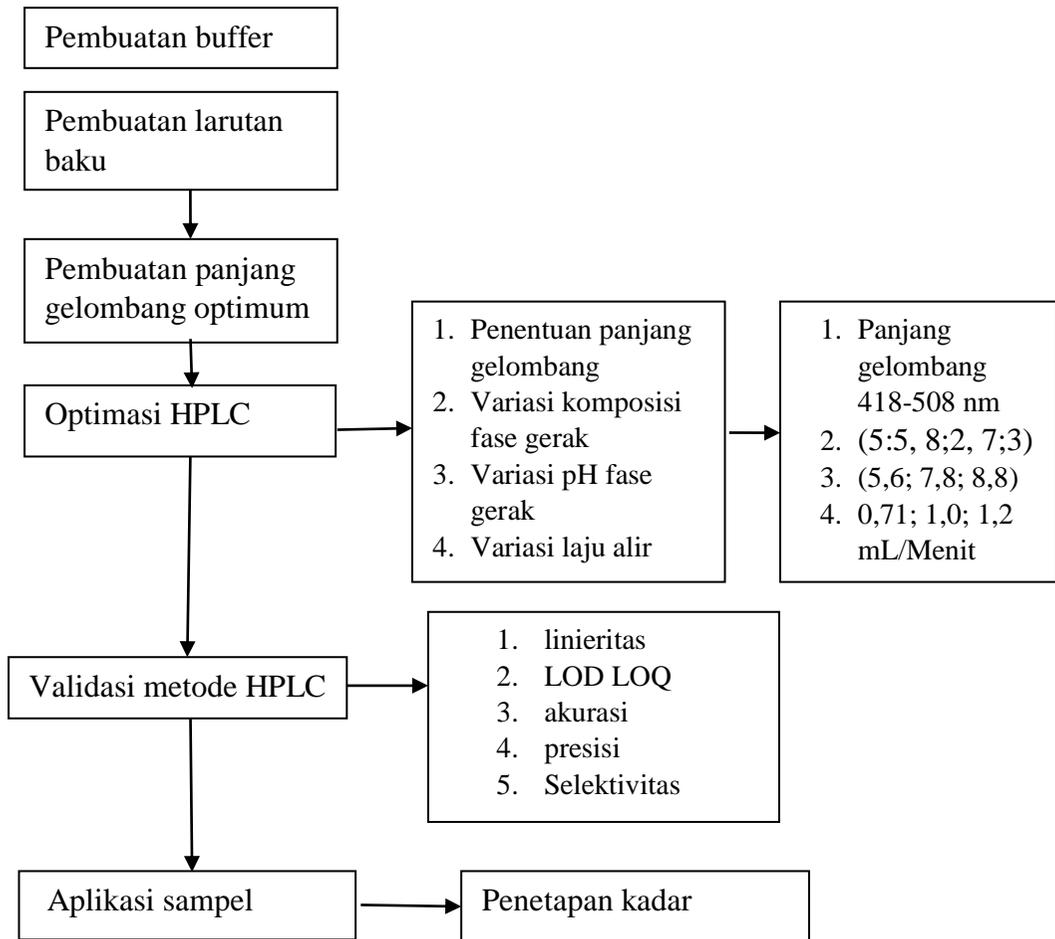
k = Angka kemurnian bahan baku (%)

P = Kadar rata-rata BTM (%)

I. Analisis hasil

Analisis hasil yang dilakukan dalam penelitian ini adalah:

1. Analisis kualitatif. Analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi (tR) yang didapat dari sampel dengan waktu retensi (tR) senyawa baku.
2. Analisis kuantitatif. Analisis kuantitatif yang dilakukan adalah penetapan kadar dari *yellow fcf*, *red allura*, *methanil*, dan *tartazin* pada sampel dan kurva baku yang masing-masing senyawa.

J. Skema alur penelitian**Gambar 12. Skema alur penelitian**