

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian adalah minyak zaitun yang dibeli di PT Merck Indonesia Tbk, Kota Jakarta.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah minyak zaitun jenis *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO)

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian yaitu minyak zaitun (*Olea europaea* L.) jenis *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO).

Variabel utama yang kedua dalam penelitian yaitu penentuan kondisi analisis dengan perbandingan variasi dilakukan pada kecepatan alir 0.8 mL/menit, 1 ml/menit, 1.5 ml/menit.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian yaitu kadar α -tokoferol dalam minyak zaitun dengan pelarut aseton menggunakan metode KCKT.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama digolongkan ke dalam beberapa variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dapat diubah dan direncanakan untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti yang lain dengan tepat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sistem KCKT dengan fase diam C_{18} , fase gerak metanol, perbandingan variasi kecepatan alir 0.8 mL/menit, 1 mL/menit, 1.5 mL/menit.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar α -tokoferol memenuhi parameter validasi yaitu linearitas, LOD, LOQ, akurasi, presisi.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah standar α -tokoferol yang bersifat mudah teroksidasi diatasi dengan penggunaan alumunium foil untuk menutupi peralatan gelas, dan kemurnian pelarut diatasi dengan penggunaan pelarut yang memiliki *grade pro analysis*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Minyak zaitun (*Olea europaea* L.) adalah minyak yang berasal dari tanaman zaitun memiliki kemurnian minyak 100%.

Kedua, sistem KCKT yang digunakan adalah fase diam (kolom *reserved-phase*) C₁₈, fase gerak metanol, perbandingan variasi kecepatan alir 0.8 mL/menit, 1 mL/menit, 1.5 mL/menit.

Ketiga, kondisi analisis terpilih berdasarkan hasil waktu retensi (tR), luas puncak, dihitung lempeng teoritis (N), HETP (*height equivalent theoretical plate*) dan asimetrisitas atau *Tailing Factor* (TF).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, labu tentukur, mikropipet, gelas ukur, beaker glass, botol vial, sonikator, filter *syringe* 0,45 μ m, piknometer, refraktometer, Spektrofotometri UV-VIS, seperangkat instrumen KCKT (Shimadzu model LC-10AS) yang dilengkapi dengan pompa, kolom LiChosper® C18 RP(fase terbalik) 15cm x 5 μ m, detektor spektro UV-VIS SPD – 10A, dan pemroses data Class C-R10.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah minyak zaitun (*Olea europaea* L.) jenis *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan kemurnian 100% (Bertolli), akuades, standart α -tokoferol ($\geq 96\%$) grade HPLC (sigma), metanol *pro-analysis* (Merck), aseton *pro-analysis* (Merck).

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Larutan Induk 50 mg/L

Baku α -tokoferol ditimbang 100 mg dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL (1000 mg/L) dilarutkan dengan aseton hingga tanda batas, kemudian dipipet 5 mL dimasukkan kedalam labu takar 100 mL (50 mg/L) dilarutkan dengan aseton hingga tanda batas.

2. Pembuatan Fase Gerak

Pembuatan fase gerak menggunakan 100 mL metanol disaring menggunakan *filter syringe* 0.45 μm , kemudian disonikasi selama 2 menit dan dipasang pada alat KCKT. Elusi dilakukan secara isokratik dengan kondisi analisis terpilih.

3. Optimasi Kondisi Analisis

3.1 Optimasi Panjang Gelombang Maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan menggunakan spektro UV-Vis. Larutan baku diukur absorbansinya untuk menentukan panjang gelombang maksimum pada kisaran 350-250 nm (Hilma *et al.*, 2019). Panjang gelombang maksimum yang diperoleh ditentukan dari nilai absorbansi tertinggi.

3.2 Optimasi kecepatan alir. Variasi perbandingan dilakukan pada kecepatan alir yaitu 0.8 mL/menit, 1 mL/menit, 1.5 mL/menit. Larutan induk diambil sedikit disaring menggunakan *filter syringe* 0,45 μm dimasukkan dalam vial dan disonikasi selama 2 menit. Sebanyak 10 μL diinjeksikan ke dalam kolom KCKT fase gerak metanol, panjang gelombang terpilih dalam perbandingan variasi kecepatan alir yang dilakukan. Dicatat waktu retensi (t_R), luas puncak, dihitung lempeng teoritis (N), HETP (*height equivalent theoretical plate*) dan asimetrisitas atau *Tailing Factor* (TF). Hasil analisis yang diperoleh dari perbandingan variasi kecepatan alir dibandingkan dan optimasi terpilih digunakan untuk analisis selanjutnya.

4. Pengujian Sampel

4.1 Pengujian BJ (Bobot Jenis). Piknometer 50 mL dibersihkan dan dikeringkan. Piknometer kosong ditimbang dan dicatat beratnya, kemudian diisi

dengan aquades yang telah mendidih hingga meluap dan tidak terbentuk gelembung udara, kemudian direndam dalam *waterbath* bersuhu 30°C dan dibiarkan pada suhu konstan selama 30 menit. Piknometer diangkat dan dikeringkan, kemudian piknometer dan isinya ditimbang dan dicatat beratnya. Bobot air adalah selisih bobot piknometer dengan isinya dikurangi bobot piknometer kosong.

Piknometer dibersihkan dan dikeringkan. Minyak disaring dengan kertas saring, kemudian dimasukkan dalam piknometer sampai meluap dan tidak terbentuk gelembung udara. Piknometer direndam dalam *waterbath* sampai suhu 30°C dan dibiarkan 30 menit hingga suhu yang diperoleh konstan. Piknometer diangkat dan dikeringkan, kemudian piknometer dan isinya ditimbang dan dicatat beratnya. Bobot minyak adalah selisih bobot piknometer dengan isinya dikurangi piknometer kosong. Bobot jenis minyak pada suhu 30°C dihitung menggunakan rumus :

$$BJ = \frac{(\text{berat piknometer} + \text{minyak}) - (\text{berat piknometer kosong})}{\text{Volume piknometer}}$$

(Noedjeng, 2013)

Minyak zaitun memiliki bobot jenis 0,910-0,915 (FI VI, 2020)

4.2 Pengujian Indeks Bias. Pengujian indeks bias menggunakan alat refraktometer. Alat dibersihkan dan ditetes tiga tetes aquades diatas kaca prisma, kemudian kaca prisma ditutup perlahan dan harus dipastikan bahwa aquades memenuhi permukaan kaca prisma. Tutup sumber cahaya dibuka dan pembacaan melalui lensa mata atau teropong. Posisi gelap terang diatur menggunakan knop untuk mengukur skala indeks bias. Skala indeks bias dilihat dari garis batas gelap terang tepat pada perpotongan garis silang bagian bawah. Kalibrasi sudah benar jika indeks bias air yang dihasilkan adalah n:1,33. Pengujian pada sampel minyak zaitun dilakukan dengan cara yang sama pada saat kalibrasi, dan dicatat nilai indeks bias. Minyak zaitun memiliki indeks bias 1,4677 – 1,4705.

4.3 Analisis dengan KCKT. Sampel minyak zaitun dipipet sebanyak 0,25 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambah larutan standar (spike) 0,5 mL, kemudian dilarutkan dengan aseton hingga tanda batas. Sampel

larutan disaring menggunakan *filter syringe* 0,45 μm dimasukkan dalam vial dan disonikasi selama 2 menit. Sampel diinjeksikan Sebanyak 10 μl ke dalam kolom KCKT fase gerak metanol, pada panjang gelombang terpilih, dilakukan pada kecepatan alir terpilih, direplikasi 3x dan dicatat luas area yang dihasilkan.

5. Pembuatan Kurva Baku

Pembuatan kurva baku konsentrasi 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L. Setiap konsentrasi disaring menggunakan *filter syringe* 0,45 μm dimasukkan ke dalam vial dan disonikasi selama 2 menit.

6. Validasi Metode

6.1 Linearitas. Seri larutan standar α -tokoferol dengan konsentrasi 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,3 mg/L, 0,4 mg/L, 0,5 mg/L, 0,6 mg/L masing-masing disuntikkan sebanyak 10 μL ke dalam kolom KCKT pada kondisi analisis terpilih. Pengukuran hasil dari data dibuat kurva kalibrasi menggunakan persamaan garis regresi linear ($y=a+bx$). Linearitas dari kurva kalibrasi dilihat dengan menghitung koefisien korelasi (r) dari persamaan garis linear.

6.2 LOD dan LOQ. LOD dan LOQ diperoleh dari persamaan garis linier dari kurva kalibrasi dengan rumus :

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \left(\frac{Sy}{x} \right)}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \left(\frac{Sy}{x} \right)}{b}$$

Dimana (Sy/x) adalah simpangan baku residual, b adalah slope dari persamaan garis regresi linier.

6.3 Kecermatan atau Akurasi. Akurasi dilakukan dalam 3 seri konsentrasi yang berbeda yaitu 80%, 100%, 120% dari salah satu konsentrasi linearitas. Pembuatan sampel berupa minyak zaitun ditimbang 100 mg dimasukkan kedalam labu takar 100 mL (1000 mg/L) ditambah larutan induk standar (spike) 0,5 mL dan ditambah pelarut hingga tanda batas, kemudian dipipet 5 mL dimasukkan dalam labu takar 100 mL (50 mg/L) dilarutkan dengan aseton hingga tanda batas. Masing-masing konsentrasi disaring menggunakan *filter syringe* 0,45 μm dimasukkan dalam vial dan disonikasi selama 2 menit. 3 seri

konsentrasi diinjeksikan dalam kolom KCKT 10 μL sesuai dengan kondisi analisis terpilih, diperoleh luas puncak dan dihitung persen perolehan kembali (*recovery*) dengan rumus :

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{(\text{CF} - \text{CA})}{\text{C} * \text{A}} \times 100$$

6.4 Keseksamaan atau Presisi. Presisi diperoleh dari salah satu konsentrasi linearitas untuk dilakukan sebanyak 6x replikasi. Pembuatan sampel berupa minyak zaitun ditimbang 100 mg dimasukkan kedalam labu takar 100 mL (1000 mg/L) ditambah larutan induk standar (spike) 0,5 mL dan ditambah pelarut hingga tanda batas, kemudian dipipet 10 mL dimasukkan dalam labu takar 100 mL (100 mg/L) dilarutkan dengan aseton hingga tanda batas. Larutan disaring menggunakan *filter syringe* 0,45 μm dimasukkan dalam vial dan disonikasi selama 2 menit. Larutan diinjeksikan dalam kolom KCKT 10 μL sesuai dengan kondisi analisis terpilih, dilakukan 6x replikasi. Presisi dapat dihitung dengan rumus simpangan baku :

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

E. Analisis Hasil

Hasil penelitian berupa data nilai luas daerah baik data sampel maupun data analisis validasi pada spektra. Analisis data metode KCKT dibantu dengan pemroses data Class C-R10 untuk mencetak hasil analisis instrumen KCKT. Pengolahan data menggunakan Microsoft Excel 2010 meliputi hasil analisis parameter validasi linearitas, LOD, LOQ, akurasi, presisi. Perbandingan variasi dilakukan pada kecepatan alir 0.8 mL/menit, 1 mL/menit, 1.5 mL/menit diperoleh luas area dan dihitung :

1. Waktu Retensi

Waktu retensi dinyatakan sebagai t_R dalam satuan menit, waktu retensi diperoleh dari waktu yang dibutuhkan oleh senyawa komponen sampel untuk melewati kolom menuju detektor.

2. Jumlah Pelat Teori (N)

Efisiensi kolom dapat diperoleh dengan menghitung efisiensi kolom.

Dihitung dengan rumus :

$$N = 16 \left(\frac{tR}{W} \right)^2$$

Keterangan :

tR : waktu retensi analit

W : lebar dasar puncak

3. Height Equivalent Theoretical Plate (HETP)

HETP merupakan panjang kolom pada KCKT yang dibutuhkan sampai terjadi 1x keseimbangan molekul komponen pada fase gerak dan fase diam. HETP dinyatakan dengan rumus :

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Keterangan :

L : panjang kolom

N : jumlah plat teori

4. Faktor Simetris (TF)

Terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram menjadi tidak simetris. TF dinyatakan dengan rumus :

$$TF = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Keterangan :

$W_{0,05}$: jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak

F : lebar setengah dasar puncak