

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Penelitian dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya zat pewarna Rhodamin B dalam saus tomat yang dijual di pasar Lawang, Kabupaten Malang. Metode pada penelitian ini adalah deskriptif kualitatif untuk mengetahui gambaran apakah saus tomat yang digunakan oleh pedagang yang beredar di pasar Lawang, Kabupaten Malang mengandung pewarna Rhodamin B yang dideteksi berdasarkan bercak noda dan nilai Rf.

Penelitian ini meliputi tiga tahap kerja yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan penelitian, dan pengumpulan data. Pertama, tahap persiapan meliputi pengumpulan sampel saus tomat, persiapan alat dan bahan. Kedua, tahap pelaksanaan dalam penelitian ini meliputi optimasi eluen dan uji kualitatif sampel menggunakan kromatografi kertas. Pada tahap ini pengujian sampel dilakukan sebanyak 3 kali (triplo). Parameter yang diamati adalah kemiripan warna larutan antara larutan baku dan larutan sampel, bercak noda yang dihasilkan, serta nilai Rf yang diperoleh. Ketiga, tahap pengumpulan data, menganalisa data, dan membuat kesimpulan dari data yang diperoleh.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **3.2.1 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang dan laboratorium Farmasi Universitas Machung Malang.

##### **3.2.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari penyusunan proposal sampai dalam kurun waktu terselesaikannya karya tulis ilmiah ini (Desember-Juni).

#### **3.3 Bahan dan Alat**

##### **3.3.1 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel saus tomat, standar Rhodamin B, benang wol, akuades, asam asetat glasial p.a, amonia pekat, larutan asam asetat 10%, larutan amonia 2%, larutan amonia, alkohol 96%, alkohol 50%, etanol 70%, NaCl, NaOH.

##### **3.3.2 Alat**

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah gelas kimia, batang pengaduk, chamber, penangas air, spatula, neraca, kertas saring halus, labu ukur 100 mL, labu ukur 10 mL, pipa kapiler, pensil, penggaris, gunting, lidi.

### 3.4 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat satu variabel dan variabel ini tidak dapat didefinisikan sebagai variabel bebas ataupun variabel terikat. Variabel dalam penelitian ini yaitu, Rhodamin B pada saus tomat.

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil	Skala Pengukuran
Rhodamin B pada saus tomat	Bercak Rhodamin B dari proses analisis menggunakan Kromatografi kertas	Penggaris	Warna bercak noda dan nilai Rf	Ordinal
Variasi fase gerak	Digunakan 4 jenis fase gerak yaitu eluen 1 (n-butanol, asam asetat, air, dengan perbandingan 4:5:1), eluen 3 (NaCl 2% dalam alkohol 50%), eluen 5 (n-butanol, asam asetat, air dengan perbandingan 4:2:2,4), eluen campuran n-butanol, amonia, asamasetat dengan perbandingan 11:5:4.	Pengamatan visual bentuk noda, penggaris	Warna bercak noda dan nilai Rf	Ordinal

### 3.6 Metode Penelitian

#### 3.6.1 Populasi

Populasi yang digunakan mencakup seluruh saus tomat yang diperdagangkan di Pasar Lawang, Kabupaten Malang.

### 3.6.2 Sampling

Sampling yang digunakan yaitu sampel saus tomat yang berwarna merah mencolok, dengan *range* harga Rp 4.000 sampai Rp 15.000 sudah mendapat  $\geq 500$  gram serta mereknya tidak boleh sama satu sama lain.

### 3.6.3 Prosedur analisis (SNI 01-2895-1992)

#### a. Pembuatan fase gerak

Fase gerak pada penelitian ini terdiri dari 4 macam fase gerak yaitu :

1. Eluen 1 (n-butanol, asam asetat, air, dengan perbandingan 4:5:1)

Pembuatan eluen 1 dilakukan dengan cara memipet 4 mL n-butanol dan dimasukkan gelas kimia 600 mL, kemudian ditambahkan 5 mL asam asetat, dan 1 mL akuades. Setelah itu, gelas kimia ditutup menggunakan plastik wrap dan kemudian larutan dihomogenkan serta dijenuhkan.

2. Eluen 3 (NaCl 2% dalam alkohol 50%)

Pembuatan eluen 3 dilakukan dengan cara mengencerkan alkohol 96% menjadi alkohol 50%. Pertama memipet 52 mL alkohol 96%, kemudian diencerkan di dalam labu ukur 100 mL menggunakan akuades. Setelah itu, menimbang NaCl sebanyak 2 gram, kemudian dilarutkan dalam 100 mL alkohol 50%. Eluen dipipet sebanyak 15 mL dan dimasukkan ke dalam gelas kimia 600 mL yang ditutup menggunakan plastik wrap. Kemudian eluen dihomogenkan serta dijenuhkan.

3. Eluen 5 (n-butanol, asam asetat, air dengan perbandingan 4:2:2,4).

Pembuatan eluen 5 dilakukan dengan cara memipet 4 mL n-butanol dan dimasukkan gelas kimia 600 mL, kemudian ditambahkan 2 mL asam asetat, dan 2,4 mL akuades. Setelah itu, gelas kimia ditutup menggunakan plastik wrap dan kemudian larutan dihomogenkan serta dijenuhkan.

4. Eluen campuran n-butanol, amonia, asam asetat dengan perbandingan 11:5:4.

Pembuatan eluen campuran n-butanol:amonia:asam asetat (11:5:4) dilakukan dengan cara memipet 11 mL n-butanol dan dimasukkan gelas kimia 600 mL, kemudian ditambahkan 5 mL asam amonia, dan 4 mL asam asetat. Setelah itu, gelas kimia ditutup menggunakan plastik wrap dan kemudian larutan dihomogenkan serta dijenuhkan.

Setelah dilakukan optimasi eluen, akan dipilih satu eluen yang menghasilkan hasil paling optimal. Eluen yang paling optimal tersebut akan digunakan untuk proses pengujian.

#### **b. Persiapan Benang Wol Bebas Lemak**

Benang wol terlebih dahulu dipotong sepanjang 24 cm. Kemudian benang wol dididihkan dalam akuades dan dikeringkan. Kemudian dicuci dengan kloroform dan dididihkan dalam NaOH 1% dan dibilas dengan akuades. Kemudian dikeringkan.

#### **c. Persiapan Kertas Kromatografi**

Kertas kromatografi diukur 8 cm x 12 cm, kemudian dipotong sesuai dengan pengukuran yang telah dilakukan. Diberi tanda batas bawah dan batas atas 0,5 cm dan batas bawah 1,5 cm. Kertas kromatografi dibagi menjadi 2 area untuk standar dan sampel dengan jarak penotolan antar keduanya minimal 2 cm. Kemudian padabagian atas kertas kromatografi ditempelkan lidi secara horizontal.

#### **d. Pembuatan Kontrol Positif (Adisi Awal)**

Standar ditimbang sebanyak 20 mg dan ditambahkan sampel sebanyak 10 gram, kemudian ditambahkan 20 mL amonia 2% (yang dilarutkan dalam etanol 70%) dan direndam selama  $\pm 24$  jam. Setelah itu, larutan sampel disaring dan dipanaskan. Residu hasil pemanasan ditambahkan 10 mL asam asetat 10%. Setelah itu, dimasukkan benang wol ke dalam larutan sampel tadi. Dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih selama 10 menit. Kemudian diambil benang wol, dan dicuci menggunakan akuades. Setelah itu, benang wol dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan 10 mL larutan amonia 10% (yang dilarutkan dalam etanol 70%). Dipanaskan di atas penangas air hingga zat warna pada benang wol luntur.

#### **e. Pembuatan Kontrol Positif (Adisi Akhir)**

Sampel ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian ditambahkan 20 mL amonia 2% (yang dilarutkan dalam etanol 70%) dan direndam selama  $\pm 24$  jam. Setelah itu, larutan sampel disaring dan dipanaskan. Residu hasil pemanasan ditambahkan 10 mL asam asetat 10%. Setelah itu, dimasukkan benang wol ke dalam larutan sampel tadi. Dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih selama 10 menit. Kemudian diambil benang wol, dan dicuci menggunakan akuades.

Setelah itu, benang wol dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan 10 mL larutan amonia 10% (yang dilarutkan dalam etanol 70%). Dipanaskan di atas penangas air hingga zat warna pada benang wol luntur. Larutan uji yang dihasilkan dibagi menjadi 2 gelas kimia, pada salah satu gelas kimia tersebut ditambahkan serbuk standar Rhodamin B sehingga menjadi kontrol positif.

#### **f. Pembuatan Kontrol Negatif**

Sampel ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian ditambahkan 20 mL amonia 2% (yang dilarutkan dalam etanol 70%) dan direndam selama  $\pm 24$  jam. Setelah itu, larutan sampel disaring dan dipanaskan. Residu hasil pemanasan ditambahkan 10 mL asam asetat 10%. Setelah itu, dimasukkan benang wol ke dalam larutan sampel tadi. Dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih selama 10 menit. Kemudian diambil benang wol, dan dicuci menggunakan akuades. Setelah itu, benang wol dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan 10 mL larutan amonia 10% (yang dilarutkan dalam etanol 70%). Dipanaskan di atas penangas air hingga zat warna pada benang wol luntur.

#### **g. Pengambilan Zat Warna**

Sampel ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian ditambahkan 20 mL amonia 2% (yang dilarutkan dalam etanol 70%) dan direndam selama  $\pm 24$  jam. Setelah itu, larutan sampel disaring dan dipanaskan. Residu hasil pemanasan ditambahkan 10 mL asam asetat 10%. Setelah itu, dimasukkan benang wol ke dalam larutan sampel tadi. Dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih selama 10 menit. Kemudian diambil benang wol, dan dicuci menggunakan akuades. Setelah itu, benang wol dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan 10 mL larutan amonia 10% (yang dilarutkan dalam etanol 70%). Dipanaskan di atas penangas air hingga zat warna pada benang wol luntur.

#### **h. Pembuatan Larutan Standar**

Standar Rhodamin B ditimbang 10 mg di dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan sedikit etanol 70%. Kemudian diencerkan dalam labu ukur 10 mL menggunakan etanol 70%.

#### **i. Persiapan Kromatografi Kertas**

Ditotolkan sebanyak 5 totol larutan standar di atas kertas kromatografi sisi kiri dan ditotolkan sebanyak 5 totol juga larutan sampel hasil pemekatan di

kertas kromatografi sisi kanan dengan menggunakan pipa kapiler.

#### **j. Optimasi Eluen**

Optimasi eluen dilakukan dengan cara mengelusi noda standar dan noda sampel yang telah ditotolkan pada kertas kromatografi menggunakan eluen yang telah dibuat dan dijenuhkan sebelumnya yaitu eluen 1 (n-butanol, asam asetat, air, dengan perbandingan 4:5:1), eluen 2 (NaCl 2% dalam alkohol 50%), eluen 3 (n-butanol, asam asetat, air dengan perbandingan 4:2:2,4) dari SNI 01-2895-1992 dan eluen campuran n-butanol, amonia, asam asetat dengan perbandingan 11:5:4.

#### **k. Pengujian**

Pengujian dilakukan setelah optimasi eluen dilakukan. Kertas kromatografi yang telah terdapat bercak standar dan bercak sampel hasil penotolan (masing-masing sebanyak 5 totol), dielusi menggunakan eluen hasil optimasi yang memberikan hasil yang terbaik. Setelah itu, kertas kromatografi dikeringkan dan dihitung nilai Rf.

### **3.7 Metode Analisis**

Analisa data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara mengamati secara visual ada atau tidaknya kemiripan warna larutan standar dan larutan uji, dan nilai Rf.

### **3.8 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data**

Pengolahan data dilakukan dengan rumus perhitungan Rf yaitu :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Kemudian dihitung nilai rata-rata Rf dari 3 kali pengujian sampel. Penyajian data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel yang memuat tentang sampel, bercak noda, dan nilai Rf.