

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian validasi metode dan penentuan cemaran melamin dalam susu formula menggunakan HPLC Hitachi D-7000 dilaksanakan di Laboratorium Kimia Instrumen dan Laboratorium Riset Jurusan Pendidikan Kimia, Universitas Pendidikan Indonesia yang berlokasi di jalan Dr. Setiabudi No. 22 Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

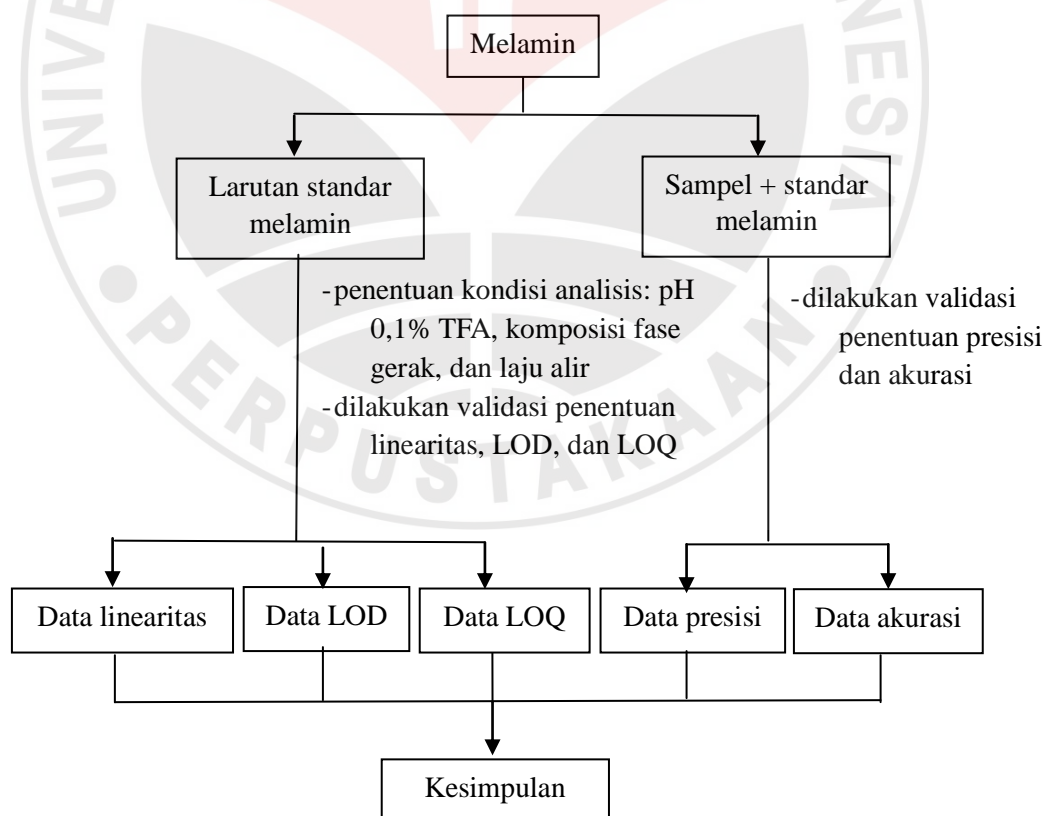
Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca analitik dengan ketelitian 4 desimal, labu ukur 10 mL, 25 mL, dan 50 mL, gelas ukur 10 mL, 100 mL, dan 500 mL, gelas kimia 20 mL, 50 mL, 100, mL dan 250 mL, botol semprot 250 mL, sentrifuse, tabung sentrifuse, pipet volum 1 mL, 2 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, dan 7 mL, ball pipet, pH meter, corong tangkai pendek, mikropipet, batang pengaduk, spatula, tabung reaksi, botol vial, pipet tetes, pipet ukur 0,1 mL, *ultrasonic vibrator*, penyaringan vakum, membran nitrat selulosa, membran PTFE, syring 10 μ L, dan instrumen HPLC Hitachi D-7000 menggunakan kolom C18 dengan spesifikasi L-7300, detektor UV L-7400 dan pompa L-7100.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya sampel susu formula, melamin murni ($\geq 99\%$), metanol *grade* for HPLC, asam trifloroasetat (TFA), asam trikloroasetat (TCA), NaOH dan aquabides, dan kertas saring Whatman.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian validasi metode penentuan cemaran melamin dalam susu formula yang dilakukan mengacu pada prosedur penelitian sebelumnya, yakni metode analisis yang telah dikembangkan dan diuji validitasnya oleh Venkatasami dan Sowa Jr (2010). Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan meliputi tahap preparasi, penentuan kondisi analisis dan validasi metode. Adapun parameter validasi yang diuji diantaranya linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantisasi (LOQ), presisi, dan akurasi. Bagan alir tahapan penelitian secara keseluruhan ditampilkan pada gambar 3.1 berikut:



Gambar 3.1 Bagan alir tahapan penelitian

3.3.1 Preparasi

a. Preparasi fase gerak

1. Fase gerak 0,1% TFA

Satu liter aquabides dimasukkan ke dalam gelas ukur. Ditambahkan 1 mL TFA. Fase gerak dihomogenkan menggunakan *ultrasonic vibrator* dan di-adjust pHnya. Kemudian fase gerak tersebut disaring secara vakum menggunakan membran nitrat selulosa. Filtrat dimasukkan ke dalam botol fase gerak (PET *Radiopharmaceutical Sciences*, 2007).

2. Fase gerak metanol

Sebanyak 500 mL metanol dimasukkan dalam gelas ukur. Fase gerak disaring menggunakan membran PTFE. Fase gerak yang telah disaring dihomogenkan selama 15 menit, lalu dimasukkan ke dalam botol fase gerak.

b. Preparasi larutan stok melamin

1. Pelarut

Pelarut merupakan larutan metanol 50% (v/v) yang dibuat dengan mencampurkan sejumlah volume yang sama metanol dan air.

2. Larutan stok melamin 500 ppm

Sebanyak 25 mg melamin dimasukkan dalam labu ukur 50 mL, ditambah metanol 50% sehingga konsentrasinya menjadi 500 ppm. Larutan tersebut dihomogenkan selama 30 menit.

3. Larutan stok melamin intermediet

Sebanyak 10 mL larutan stok melamin 500 ppm diencerkan dengan metanol 50% sehingga volumenya menjadi 50 mL dan konsentrasinya 100 ppm.

4. Larutan kerja melamin

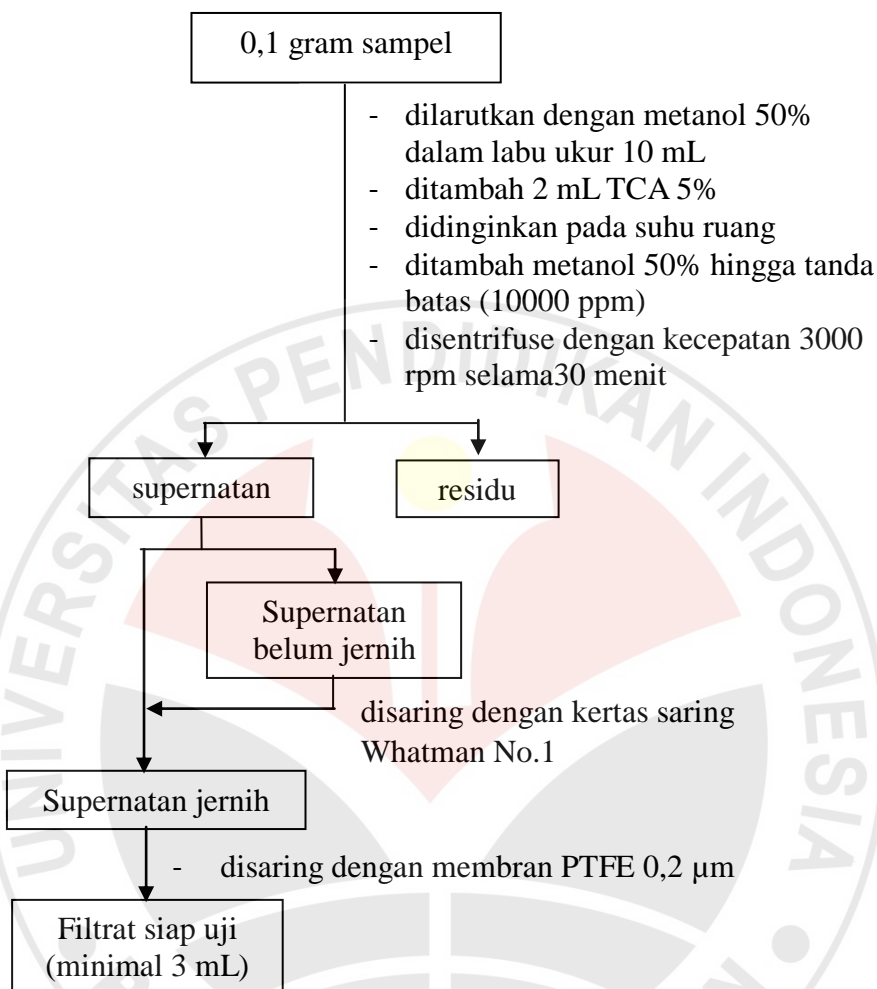
Larutan kerja diperoleh dari pengenceran larutan stok melamin intermediet ke dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh rentang konsentrasi deret standar melamin.

c. Penambahan TCA 5%

Sebanyak 0,1 gram sampel susu formula dilarutkan dalam 10 mL metanol 50%. Lalu dilakukan penambahan larutan TCA 5% dengan variasi volume 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL. Larutan dihomogenkan selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Diamati pengendapan kasein susu dan tingkat kekeruhan supernatan.

d. Preparasi sampel

Sebanyak 0,1 gram sampel susu formula dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Kemudian ke dalam sampel tersebut ditambahkan 2 mL larutan TCA 5%, diencerkan dengan metanol 50%. Larutan tersebut dihomogenkan selama 30 menit. Sampel didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan metanol 50% hingga tanda batas. Dikocok dengan hati-hati. Larutan sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang belum jernih disaring terlebih dahulu menggunakan kertas saring Whatman, selanjutnya menggunakan membran PTFE. Sementara supernatan jernih secara langsung difiltrasi menggunakan membran PTFE. Minimal sebanyak 3 mL filtrat dimasukkan dalam vial yang akan dianalisis menggunakan HPLC. Hal ini dilakukan untuk mengurangi faktor penyerapan sampel melamin oleh filter. Bagan alir preparasi sampel dapat dilihat pada gambar 3.2 berikut ini:



Gambar 3.2 Bagan alir preparasi sampel susu formula

e. Penentuan kadar cemaran melamin dalam sampel

Kadar cemaran melamin dalam sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar melamin (\%)} = \frac{X \times V_s}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

X : Konsentrasi melamin dalam sampel hasil integrasi kurva (ppm)

V_s : Volume akhir sebelum injeksi (mL)

B : Massa sampel (g)

3.3.2 Penentuan Kondisi Analisis

Dalam penelitian ini digunakan HPLC Hitachi D-7000 fase terbalik, kolom C18 (5 μm), panjang kolom 12,5 cm, suhu kolom 26°C, dan fase gerak 0,1% TFA/metanol. Volume injeksi sebanyak 10 μL dan dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 240 nm.

a. Penentuan pH

Larutan stok melamin 500 ppm disuntikkan sebanyak 10 μL ke dalam HPLC dengan 2 variasi pH fase gerak 0,1% TFA yaitu 2,4 dan 2,8.

Komposisi fase gerak yang digunakan 0,1% TFA:metanol (90:10), laju alir 1 mL/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang 240 nm. Kemudian diamati waktu retensi (RT), luas puncak, dan bentuk puncak kromatogram melamin.

b. Penentuan komposisi fase gerak

Larutan stok melamin 500 ppm disuntikkan sebanyak 10 μL ke dalam HPLC dengan berbagai variasi komposisi fase gerak 0,1% TFA:metanol yaitu 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 50:50.

Laju alir yang digunakan 1 mL/menit, pH fase gerak 2,8 dan dideteksi pada panjang gelombang 240 nm. Kemudian diamati waktu retensi (RT), luas puncak, dan bentuk puncak kromatogram melamin.

c. Penentuan laju alir

Larutan stok melamin 500 ppm disuntikkan sebanyak 10 μL ke dalam HPLC dengan 2 variasi laju alir yaitu 1 mL/menit dan 0,75 ml/menit.

Komposisi fase gerak yang digunakan 0,1% TFA:metanol (50:50), pH fase gerak 2,8 dan dideteksi pada panjang gelombang 240 nm. Kemudian diamati waktu retensi (RT), luas puncak, dan bentuk puncak kromatogram melamin.

3.3.3 Validasi Metode

a. Penentuan linearitas

Linearitas diperoleh dari pengukuran larutan deret standar yang telah dibuat sehingga diperoleh kurva kalibrasi dan persamaan regresinya. Penentuan linearitas dilakukan dengan cara membuat 7 konsentrasi larutan deret standar 1, 10, 20, 40, 50, 60, 70 ppm. Persamaan linearitas yang digunakan ialah $y = a + bx$ dengan a ialah titik potong dan b ialah kemiringan. Berdasarkan persamaan tersebut ditentukan nilai koefisien korelasinya (r).

b. Penentuan batas deteksi (LOD)

Batas deteksi ditentukan secara statistik dari hasil pengukuran linearitas berdasarkan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi.

$$\text{LOD} = \frac{3 S_{y/x}}{S_1}$$

Keterangan :

$S_{y/x}$ = simpangan baku (SD)

S_1 = kemiringan (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

c. Batas kuantisasi (LOQ)

Batas kuantisasi ditentukan secara statistik dari hasil pengukuran linearitas berdasarkan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi.

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{S_1}$$

Keterangan :

$S_{y/x}$ = simpangan baku (SD)

SI = kemiringan (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

d. Penentuan presisi

Uji presisi dilakukan dengan cara pengulangan (*repeatability*). Sebanyak 0,25 gram sampel susu formula dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan 4 mL larutan standar melamin 250 ppm. Perlakuan selanjutnya sama seperti preparasi sampel. Larutan tersebut diinjekkan sebanyak 6 kali ulangan pada hari yang sama sehingga diperoleh data yang akan dinyatakan nilai presisinya sebagai simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatif (% RSD) yang dirumuskan sebagai berikut:

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

$$\% RSD = \frac{100 \times SD}{\bar{x}}$$

Keterangan :

X : nilai masing-masing pengukuran

\bar{x} : rata-rata pengukuran

n : banyaknya data

$n - 1$: derajat kebebasan

e. Penentuan akurasi

Akurasi diperoleh dari uji persen perolehan kembali (*recovery*) berdasarkan metode standar adisi. Sampel susu formula diadisi dengan larutan standar melamin 40 ppm dan 70 ppm.

Dian Novita Zebua, 2013

Validasi Metode Dan Penentuan Cemar Melamin Dalam Susu Formula Menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* Hitachi D 7000
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

Sebanyak 0,25 gram sampel susu formula dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan 4 mL larutan standar melamin 250 ppm. Perlakuan selanjutnya sama seperti preparasi sampel. Percobaan diulangi untuk penambahan 7 mL larutan standar yang sama. Pengukuran diulangi sebanyak 3 kali. Nilai akurasi dinyatakan sebagai % perolehan kembali dan dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{C_F - C_A}{C^*_A} \times 100\%$$

Keterangan:

C_F : konsentrasi total sampel dari pengukuran

C_A : konsentrasi sampel sebenarnya

C^*_A : konsentrasi analit yang ditambahkan