

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Tanah Balai Penelitian Tanaman Sayuran (BALITSA), jalan Tangkuban Perahu No. 157 Lembang, Bandung.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas (corong kaca, labu *Kyeldhal* 50 mL, labu ukur 100 mL, 50 mL dan 10 mL, tabung reaksi, pipet volumetri 5 mL dan 1 mL), neraca analitik, *micropipet* 0.5 mL, oven, *grinder*, *dispenser*, cepuk kaleng, desikator, botol semprot, *magnetic stirrer*, kertas saring, untuk keperluan ekstraksi menggunakan set alat destruksi dan untuk keperluan analisis menggunakan spektrofotometri serapan atom (SAA) SensAA seri A.6311 Dual GBC *Scientific Equipment*.

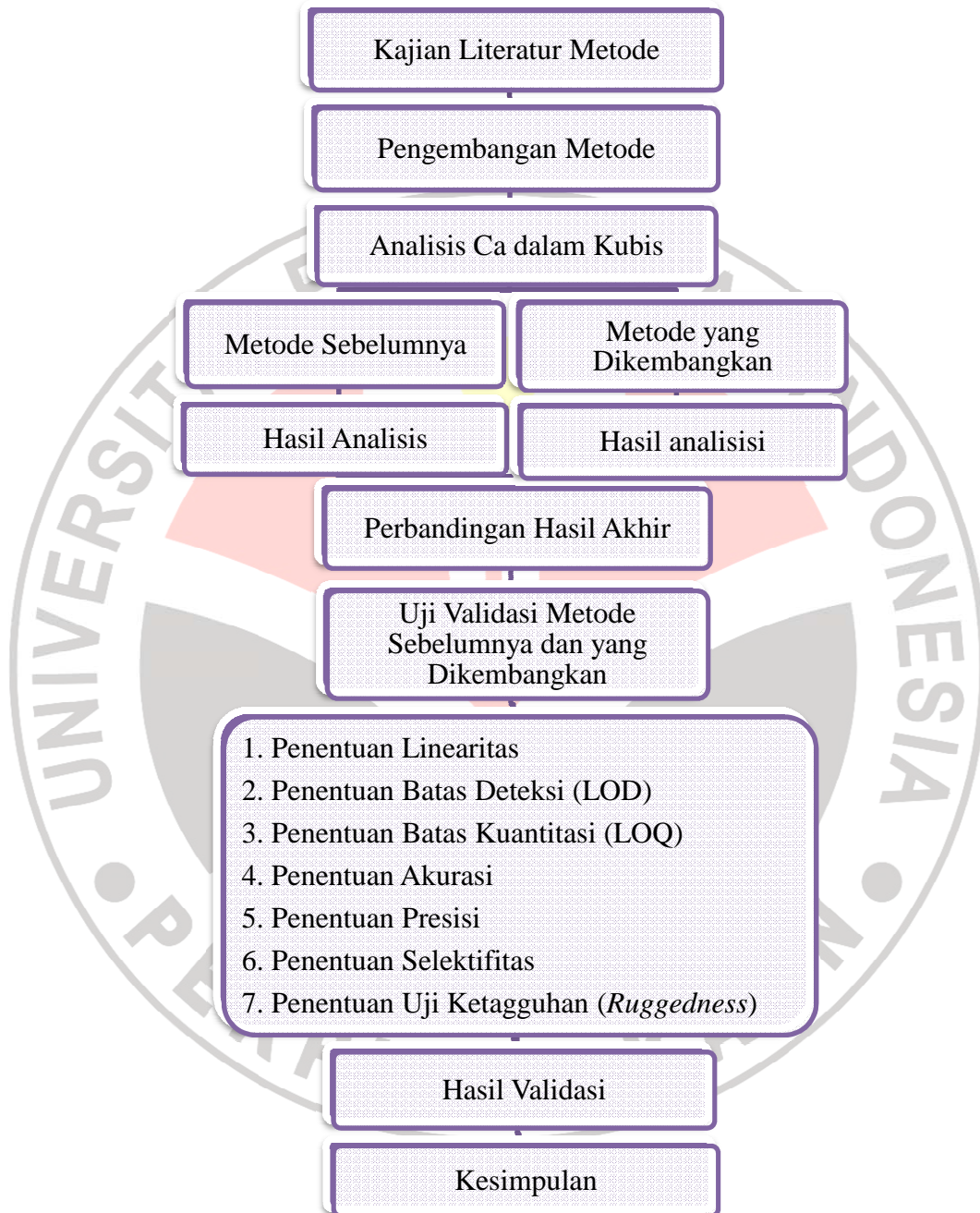
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kubis yang telah dikeringkan terlebih dahulu, HClO_4 pa, HClO_4 0,1 M, HNO_3 pa, aquades, larutan standar Ca 1000 ppm, lantan nitrat 4000 ppm, dan deret larutan standar.

3.3 Metode Penelitian

Metodologi yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pada acuan prosedur yang ada di Laboratorium Tanah BALITSA yang mengadopsi dari prosedur yang ada di Balai Penelitian Tanah yang belum terstandarisasi.

Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa tahapan pengerjaan seperti terdapat pada bagan alir penelitian berikut ini.



Gambar 3.1 Bagan Alir Pengembangan Metode Analisis Penetapan Kadar Kalsium Pada Tanaman Kubis

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi kajian literatur metode, pengembangan metode, analisis Ca dalam sampel dengan metode sebelumnya dan metode yang dikembangkan kemudian dilanjutkan perbandingan hasil antara metode sebelumnya dengan metode yang dikembangkan lalu uji validasi metode sebelumnya dan metode yang dikembangkan dan pengolahan data hasil uji validasi.

3.4.1 Kajian Literatur

Kalsium merupakan salah satu mikronutrien yang menentukan kualitas hidup manusia. Maka monitoring dari kandungan kalsium dalam sayuran dalam hal ini adalah kubis dilakukan oleh lembaga terkait terutama dilakukan oleh pihak Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran (BALITSA). Kajian literatur dilakukan agar analisis kandungan kalsium dalam tanaman kubis metode SSA yang dilakukan oleh pihak BALITSA bisa menghasilkan metode yang paling optimum dan memenuhi validitas uji.

3.4.2 Pengembangan Metode

Pengembangan metode dapat dilakukan dalam semua tahapan ataupun hanya salah satu tahapan saja. Pengembangan metode dilakukan agar diperoleh hasil yang optimal dibandingkan dengan metode sebelumnya. Pada penelitian ini pengembangan dilakukan pada pembuatan deret larutan standar. Pada metode sebelumnya deret larutan standar berada pada range 0-100 ppm diperoleh dengan pemipetan langsung dari deret larutan standar Ca 1000 ppm dan penambahan

lanthan dilakukan setelah deret larutan standar dibuat kemudian dipipet 0,5 mL dan ditambahkan lanthan 4,5 mL.

Pada metode yang dikembangkan *range* deret larutan standar dirubah menjadi 0-140 ppm diperoleh dengan pemipetan dari deret larutan standar 1000 ppm yang telah diencerkan terlebih dahulu menjadi 100 ppm dan penambahan lanthan yang dilakukan diawal ketika deret larutan standar dibuat. Lanthan yang ditambahkan sebanyak 4,5 mL.

3.4.3 Analisis Kalsium dalam Sampel Metode SSA

Analisis kalsium dalam sampel metode SSA meliputi tahapan pembuatan deret larutan standar lalu preparasi sampel yang diawali dengan sampling lalu penentuan kadar air dari sampel. Tahapan selanjutnya adalah ekstraksi sampel dengan cara destruksi kemudian penentuan kadar Ca dalam sampel dengan metode SSA pada panjang gelombang 422.7 nm.

3.4.3.1 Pembuatan Deret Larutan Standar

- a. Pembuatan deret larutan standar Ca 0-100 ppm (Metode Sebelumnya)
 - a) Siapkan tabung reaksi besar (bersih dan kering) sebanyak 7 buah.
 - b) Siapkan larutan standar Ca (1000 ppm keluarkan dari dalam lemari es)
 - c) Ke dalam masing-masing labu takar 10 mL ditambahkan standar Ca sebanyak (0 mL; 0,2mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; 1 mL).
 - d) Ditandabatkan dengan larutan HClO_4 .
 - e) Dikocok hingga homogen

- f) Larutan standar yang telah ditambahkan HClO_4 dipipet kembali ke dalam tabung 7 buah reaksi sebanyak 0,5 mL.
- g) Ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi lanthan nitrat 4000 ppm sebanyak 4,5 mL.
- h) Dikocok hingga homogen
- i) Didapatkan deret larutan standar Ca (0 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm).
- b. Pembuatan deret larutan standar Ca 0-140 ppm (Metode yang dikembangkan)
- a) Siapkan labu ukur 10 mL (bersih dan kering) sebanyak 8 buah.
- b) Siapkan larutan standar Ca (1000 ppm keluarkan dari dalam lemari es). Diencerkan terlebih dahulu hingga 100 ppm dengan memipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL.
- c) Ke dalam masing-masing tabung reaksi tambahkan standar Ca sebanyak (0 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; 1 mL; 1,2 mL; 1,4 mL).
- d) Ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi lanthan nitrat 4000 ppm sebanyak 4,5 mL.
- e) Ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi larutan HClO_4 hingga tanda batas.
- f) Dikocok hingga homogen
- g) Didapatkan deret larutan standar Ca (0 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, 140 ppm).

3.4.3.2 Preparasi sampel

a) Preparasi

Pengambilan sampel acak dilakukan secara berurutan dengan interval tertentu. Dilakukan oleh bagian petugas lapangan, guna sesuai dengan fungsi keahliannya. Sampel tanaman kubis yang digunakan adalah tanaman kubis usia diatas 100 hari. Pengambilan contoh kubis dilakukan pada 10 titik suatu area dengan memilih satu buah kubis berikut akarnya. Tahapan selanjutnya tanaman kubis segar dipotong-potong dan dikeringkan pada suhu 40°C selama dua hari pertama dan 60°C untuk 2 hari selanjutnya. Dari campuran tanaman kubis yang dianggap homogen tersebut diambil contoh untuk dianalisis sebanyak 7 buah.

b) Ekstraksi sampel

Ekstraksi sampel dilakukan untuk mendapatkan ekstrak Ca dalam tanaman kubis tersebut melalui tahapan destruksi. Pada tahapan destruksi dilakukan tiga kali pengerjaan pertama pada sampel saja kedua pada sampel dengan penambahan 1 mL standar Ca 1000 ppm hal ini dilakukan sebagai tahapan *recovery* ketiga pada sampel ditambahkan 1 mL Mg 1000 ppm hal ini juga dilakukan sebagai tahapan selektifitas.

a. Pembuatan larutan HClO_4 (0,1 M)

- a) Siapkan labu ukur 100 mL (bersih dan kering)
- b) Pipet sebanyak 1 mL HClO_4 pa ke dalam labu ukur 100 mL.
- c) Ditambahkan aquades dan impitkan hingga tanda batas.
- d) Kocok hingga homogen.

b. Ekstaksi sampel kubis

- a) Ditimbang contoh halus 0,25 gram kemudian masukan kedalam labu *Kyeldhal* 50 mL (sebanyak 7 buah).
- b) Ditambahkan 2,5 mL HClO_4 pa dan 2,5 mL HNO_3 pa biarkan semalam.
- c) Didestruksi selama 2 jam (sampai uap putih hilang).
- d) Diangkat dan dinginkan.
- e) Dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL dan impitkan hingga tanda garis dengan aquades kemudian kocok hingga homogen.

3.4.3.3 Analisis Ca dalam ekstrak Kubis

Tahapan terakhir adalah analisis Ca dalam ekstrak kubis dengan menggunakan spektrofotometri serapan atom (SSA) dengan panjang gelombang yang digunakan adalah 422,7 nm, nyala oksigen-asetilena dan jangkauan kerja 1-4 μgcm^{-3} .

- a. Analisis Ca pada ekstrak sampel dan larutan deret standar.
 - a) Dipipet ekstrak sampel sebanyak (0,5 mL) ke dalam tabung rekasi lalu ditambahkan 4,5 mL larutan Lanthan Nitrat 4000 ppm kocok hingga homogen (dibuat 7 buah dari masing-masing ekstrak).
 - b) Dipipet deret larutan standar Ca metode sebelumnya dan yang dikembangkan sebanyak 5 mL ke dalam tabung rekasi.
 - c) Diukur dengan spektrofotometri serapan atom (SSA) deret standar Ca 0-100 dan 0-140 ppm sebagai pembanding.
 - d) Buat kurva kalibrasi dan hitung faktor koreksi.

3.4.4 Analisis Data Hasil Uji Validasi

Analisis data melalui statistik melalui tahapan perhitungan linearitas, LOD, LOQ, akurasi, presisi, selektifitas dan juga *ruggedness*. Perhitungan untuk linearitas dengan menggunakan persamaan regresi yang didapat dari kurva kalibrasi yaitu $Y = ax + b$ sehingga didapat koefisien korelasi yang memenuhi persyaratan yaitu:

- $\geq 0,9970$ (ICH 1995)
- $\geq 0,9980$ (WA Laboratory Operations Manager)
- $\geq 0,9980$ (AOAC)

Untuk perhitungan LOD dan LOQ jika data blanko tidak memberikan menghasilkan sinyal sehingga SD (standar deviasi) dari blanko tersebut adalah nol maka SD diganti dari data deret larutan standar dengan rumusan :

$$\text{LOD} = 3 (\text{SD}/b) \dots\dots\dots 3.1$$

$$\text{LOD} = Rb/Rs + 3s \dots\dots\dots 3.2$$

Keterangan:

- SD = Simpangan baku blanko
- b = Kemiringan garis regresi ($Y=bx+a$)
- Rb/Rs = Rata-rata blanko/Rata-rata deret standar
- S = Standar deviasi dari blanko contoh/deret standar

$$\text{LOQ} = 10 (\text{SD}/b) \dots\dots\dots 3.3$$

$$\text{LOQ} = Rb/Rs + 3s \dots\dots\dots 3.4$$

Keterangan:

- SD = Simpangan baku blanko
- b = Kemiringan garis regresi ($Y=bx+a$)
- S = Standar deviasi dari blanko contoh/deret standar
- Rb/Rs = Rata-rata blanko/Rata-rata deret standar (Sumardi, 2002;1-3)

Untuk perhitungan akurasi dilakukan dengan metode uji pungut ulang (*Recovery test*), Dihitung persen perolehan kembali (% *recovery*) dengan rumus:

$$\% Recovery = \frac{(A-B)}{C} \times 100\% \dots\dots\dots 3.5$$

Keterangan:

A = Jumlah total analit setelah ditambahkan baku

B = Jumlah total analit sebelum ditambahkan baku

C = Baku yang ditambahkan ke dalam analit. (Harmita, 2004:117).

Untuk perhitunga presisi dilakukan dengan uji reproduibilitas Relatif Standar Deviasi (RSD) dengan rumus:

$$SD = \frac{\sqrt{\sum(Xi-X)^2}}{n-1} \dots\dots\dots 3.6$$

$$\% RSD = \frac{SD}{X} \times 100\% \dots\dots\dots 3.7$$

Keterangan:

Xi = kadar sampel

X = kadar rata-rata sampel

n = jumlah perlakuan

pada pengujian *ruggedness* hanya dilihat dari kesamaan data pada hasil analisis larutan deret standar Ca, bila hasil yang didapatkan sama (pada kondisi pengujian berbeda) yang meliputi perbedaan operator, dan waktu pengerjaan maka metode tersebut mempunyai ketegaran yang bagus.

Untuk selektifitas pada ekstrak sampel ditambahkan kembali larutan deret standar Mg 1000 ppm sebanyak 0,1 mL jika (SSA) hanya dapat mendeteksi absorbansi dari Ca yang terdapat dalam ekstrak tersebut maka (SSA) tersebut mempunyai keseletifitasan yang tinggi. Perhitungan dilakukan dengan uji rata-rata (Anava).

$$t = \frac{\bar{x} (Y - Y_i)^2}{SD} \times \sqrt{\frac{n}{SD}} \dots \dots \dots 3.8$$

Keterangan :

$\bar{x} (Y - Y_i)^2$ = rata-rata selisih konsentrasi sampel + Mg dan Ca

n = jumlah sampel

SD = standar deviasi selisih konsentrasi sampel + Mg dan Ca

