

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah bubur sumsum di Pasar Harjodaksino.

Sampel merupakan objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi. Sampel pada penelitian ini adalah sirup gula merah pada bubur sumsum di Pasar Harjodaksino.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari orang, obyek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan ditarik kesimpulannya. Variabel utama dalam penelitian ini adalah kadar sakarin dan siklamat pada sirup gula merah dalam bubur sumsum di Pasar Harjodaksino.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga variabel, variabel bebas, variabel terikat dan variabel kendali. Variabel bebas adalah variabel independen atau variabel yang mempengaruhi variabel lain, variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Dalam model struktural variabel bebas juga disebut variabel endogen. Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel sirup gula merah dalam bubur sumsum yang diambil dari beberapa penjual di Pasar Harjodaksino.

Variabel terikat adalah variabel dependen atau variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas, variabel terikat merupakan akibat dari variabel bebas. Variabel terikat penelitian ini adalah hasil analisis kadar sakarin dan siklamat.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah faktor-faktor yang dapat memengaruhi kadar sakarin dan siklamat dalam sampel, seperti metode analisis yang digunakan, kondisi alat laboratorium, jenis pelarut, reagen pengujian, dan volume sampel yang diuji.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Definisi operasional variabel utama adalah uraian tentang batasan yang dimaksud, atau tentang apa yang diukur oleh variabel yang bersangkutan. Definisi operasional variabel utama merupakan hal yang penting, agar variabel dapat diukur dengan menggunakan instrumen atau alat ukur, maka variabel harus diberi batasan (Notoatmodjo, 2018). Definisi operasional variabel utama adalah sakarin dan siklamat.

Sakarin adalah pemanis buatan sintetis yang memiliki nama kimia *o-benzo sulfimide* dan rumus molekul  $C_7H_5NO_3S$ . Senyawa ini memiliki rasa 200 hingga 700 kali lebih manis daripada sukrosa. Senyawa ini tidak mengandung kalori karena tidak dapat dicerna oleh tubuh manusia. Industri pangan menggunakan sakarin sebagai bahan tambahan dalam berbagai produk seperti makanan, minuman, dan obat-obatan. Penelitian menunjukkan bahwa konsumsi sakarin dalam dosis tinggi dapat menyebabkan reaksi alergi, gangguan pencernaan, dan risiko kanker kandung kemih pada hewan uji (Herman *et al.*, 2020).

Siklamat adalah pemanis buatan yang biasanya berbentuk garam natrium atau kalsium dari asam sikloheksil sulfamat. Senyawa ini memiliki tingkat kemanisan sekitar 30 kali lebih tinggi daripada sukrosa. Industri pangan menggunakan siklamat karena kestabilannya terhadap panas dan kondisi asam. Penggunaan siklamat dalam jumlah tinggi dapat menimbulkan gangguan pada hati, tekanan darah, dan berpotensi memicu kanker kandung kemih (Yuniar, 2019).

Sirup gula merah adalah larutan manis berwarna coklat tua yang dihasilkan dari pelarutan dan pemanasan gula merah atau gula aren dalam air. Makanan tradisional sering menggunakan sirup ini sebagai bahan tambahan untuk menambah rasa manis. Produsen makanan terkadang menambahkan pemanis buatan ke dalam sirup gula merah untuk meningkatkan rasa dan menekan biaya produksi (Handayani & Agustina, 2015).

Bubur sumsum adalah makanan tradisional yang terbuat dari campuran tepung beras dan santan yang dimasak hingga mengental. Masyarakat sering menyajikan bubur sumsum dengan sirup gula merah sebagai pelengkap rasa manis. Pedagang di pasar tradisional menjual bubur sumsum sebagai makanan ringan atau sarapan. Penelitian perlu dilakukan untuk mengetahui apakah produk ini mengandung pemanis buatan yang tidak sesuai ketentuan (Astuti, 2017).

Pasar adalah tempat bertemunya penjual dan pembeli untuk melakukan kegiatan transaksi barang atau jasa. Pasar Harjodaksino merupakan pasar tradisional yang menyediakan berbagai kebutuhan pokok dan makanan olahan. Pasar ini menjadi lokasi pengambilan sampel karena menyediakan makanan siap saji yang diproduksi secara sederhana (BPOM, 2019).

Reaksi pengendapan adalah reaksi kimia yang menghasilkan zat padat atau endapan dari dua larutan yang dicampurkan. Peneliti menggunakan reaksi pengendapan dalam identifikasi zat berdasarkan terbentuknya senyawa tak larut. Reaksi ini umum digunakan dalam analisis kualitatif dan kuantitatif untuk mendeteksi keberadaan ion tertentu (Sujojo, 2015).

Reaksi warna adalah reaksi kimia yang menghasilkan perubahan warna sebagai hasil pembentukan senyawa baru. Perubahan warna ini menunjukkan keberadaan senyawa tertentu dalam larutan. Reaksi ini sering digunakan dalam metode analisis karena dapat menunjukkan hasil secara visual (Fatimah *et al.*, 2015).

Titration adalah metode analisis kuantitatif yang digunakan untuk menentukan kadar suatu zat dalam larutan. Dengan menambahkan larutan standar ke dalam larutan sampel sampai titik ekuivalen tercapai. Digunakan indikator warna atau alat ukur digital untuk mendeteksi titik akhir titrasi. Penelitian ini menggunakan metode titrasi alkalimetri untuk menganalisis sakarin dan titrasi nitrimetri untuk menganalisis siklomat (Apsari, 2019).

### C. Bahan dan Alat

Alat yang digunakan meliputi spektrofotometri UV-VIS (Shimadzu), lemari asam (Javva), corong pisah (Iwaki), buret 50 mL (Pyrex), mikro buret (Pyrex), statif, klem, pipet volume (Iwaki), pipet tetes, timbangan analitik (Ohaus), pipet *pump*, Erlenmeyer (Iwaki), gelas piala (Iwaki), labu tentukur (Iwaki), corong kaca, kertas saring, batang pengaduk, *hot plate*, vial, dan sudip.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel, baku murni natrium siklomat, akuades, es batu, HCl encer, HCl pekat, HCl 10%, BaCl 10%, NaNO<sub>2</sub> 10%, NaNO<sub>2</sub> 0,1 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, etil asetat (pa), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat, NaOH 0,5 N, NaOH 5%, NaOH 10%, NaOH 10 N, NaOCl pa (Pallav), besi (III) klorida, eter, resorsinol, asam sulfat 30%, sikloheksan (Merck), klorit 1%, kristal natrium nitrit, asam sulfanilat, sulfanilamida BPFI, pasta kanji iodida.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Uji kualitatif Sakarin

**1.1 Reaksi Warna (Kodeks, 2018).** Larutkan sampel sakarin sekitar 100 mg dalam 5 mL larutan natrium hidroksida (NaOH) 5%. Larutan diuapkan hingga kering, kemudian residu dipanaskan pada api yang kecil sampai bau amonia hilang. Residu didinginkan, dan dilarutkan dalam 20 mL air, dinetralkan dengan larutan asam hidroklorida (HCl) encer (2N). Larutan di filtrasi tersebut, kemudian tambahkan satu tetes larutan besi (III) klorida ke dalam filtrat. Terbentuk warna ungu menunjukkan sampel positif mengandung sakarin.

**1.2 Kromatografi Lapis Tipis (SNI 01-2893-1992).** Analisis kualitatif sakarin dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan sampel sebanyak 50 mL yang diasamkan dengan larutan asam sulfat sebanyak 5 mL. Sampel yang telah diasamkan, diekstraksi menggunakan 25 mL etil asetat. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dikeringkan menggunakan natrium sulfat anhidrat untuk menghilangkan sisa air, diuapkan hingga tersisa dalam volume kecil sekitar 2 mL. Larutan hasil ekstraksi tersebut ditotolkan pada pelat KLT berlapis silika gel GF254 dengan jarak antar totolan sekitar 1 cm, dikembangkan dengan fase gerak berupa campuran aseton dan amonia dalam perbandingan 9:1. Setelah pengembangan selesai, pelat dikeringkan pada suhu ruang dan noda yang terbentuk diamati di bawah sinar UV 254 nm. Pada pengamatan di panjang gelombang 254 nm, noda yang mengindikasikan keberadaan sakarin akan terlihat berwarna ungu muda. Nilai  $R_f$  dihitung dan dibandingkan dengan nilai  $R_f$  larutan baku sakarin, dimana kecocokan nilai  $R_f$  antara sampel dan baku menunjukkan adanya sakarin dalam sampel tersebut. Metode ini sederhana, cepat, dan efektif untuk mendeteksi sakarin dalam produk pangan dengan hasil yang sensitif dan selektif.

### 2. Uji Kualitatif Siklamat

**2.1 Reaksi Pengendapan (SNI 01-2893-1994).** Dipipet sampel sebanyak 50 mL dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Ditambahkan dengan 5 mL larutan HCL 10% (Asam Klorida) digunakan untuk mengasamkan larutan dan 5 mL larutan BaCl 10% dibiarkan selama 30 menit. Disaring menggunakan kertas saring. Ditambahkan dengan 5 mL larutan NaNO<sub>2</sub> 10% yang dilakukan dilemari asam dan dipanaskan diatas *hot plate* atau penangas air pada suhu sekitar 125-130 °C. Hasil akan didapat sekitar 20-30 menit, setelah dipanaskan maka

akan terbentuk endapan putih yang menandakan sampel positif mengandung siklamat.

## **2.2 Spektrofotometri UV-VIS**

**2.2.1 Panjang Gelombang Baku.** Larutan standar siklamat dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm dilakukan dengan menimbang 50 mg baku siklamat pa, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan tambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan standar siklamat dilakukan pengenceran hingga konsentrasi 80 ppm, dan larutan dimasukkan ke dalam corong pisah pertama, ditambah dengan 1 mL NaOH 10 N, 5 mL sikloheksana dan dikocok selama 1 menit. Lapisan air dipisahkan dan dimasukkan ke dalam corong pisah kedua, ditambahkan dengan 2,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%, 5 mL sikloheksana, dan 5 mL larutan NaOCl pa, dikocok selama 2 menit. Lapisan sikloheksana (lapisan atas) akan berwarna kuning kehijauan, bila tidak berwarna ditambahkan lagi larutan NaOCl kurang lebih 5 mL. Lapisan air dibuang, dan lapisan sikloheksana dicuci dengan 25 mL NaOH 0,5 N dan dikocok selama 1 menit dan lapisan bawah dibuang, lapisan sikloheksana dikocok dengan 25 mL air, diambil lapisan sikloheksana dan lapisan air dibuang. Dimasukkan ke dalam botol/vial dan di cek menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan bandingkan dengan panjang gelombang dengan sampel.

**2.2.2 Panjang Gelombang Sampel.** Dipipet sampel sebanyak 50 mL dimasukkan ke dalam corong pisah pertama, ditambah dengan 2,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan didinginkan. Setelah dingin ditambah dengan 50 mL etil asetat dikocok selama 2 menit dan diambil  $\pm$  40 mL bagian yang jernih kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah kedua diekstraksi dengan 15 mL air yang dilakukan dengan 3 kali pengulangan dan dimasukkan ke dalam corong pisah ke-tiga ditambahkan dengan 1 mL NaOH 10 N dan 5 mL sikloheksana, dikocok selama satu menit. Lapisan atas dibuang lapisan air dimasukkan ke dalam corong pisah ke-empat ditambahkan 2,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%, 5 mL sikloheksana, dan 5 mL larutan NaOCl pa, dikocok selama 2 menit. Lapisan sikloheksana (lapisan atas) akan berwarna kuning kehijauan, bila tidak berwarna ditambahkan lagi larutan NaOCl 5 mL. Lapisan air dibuang kemudian lapisan sikloheksana dicuci dengan 25 mL NaOH 0,5 N dan dikocok selama 1 menit dan lapisan bawah dibuang, lapisan sikloheksana dikocok dengan 25 mL air, diambil lapisan sikloheksana dan lapisan air dibuang. Dimasukkan dalam botol/vial dan di cek menggunakan spektrofotometer

UV-Vis dan bandingkan dengan panjang gelombang dengan larutan standar baku siklamat.

### **3. Uji Kuantitatif Siklamat dengan Metode Titrasi Nitrimetri**

**3.1 Preparasi Sampel.** Sampel ditimbang dengan seksama lebih kurang 4 gram, dilarutkan dalam campuran larutan 50 mL air dan 5 mL asam hidroklorida encer, diaduk hingga homogen.

**3.2 Pembuatan Larutan Sekunder Natrium Nitrit 0,1 M 300 mL.** Menimbang dengan seksama 2,07 gram kristal natrium nitrit dan memasukkan ke dalam gelas beaker 300 mL menambahkan akuades hingga 300 mL dan dihomogenkan.

**3.3 Standarisasi Natrium Nitrit.** Menimbang dengan seksama 500 mg sulfanilamida BPFI dan memasukkan ke dalam Erlenmeyer. Menambahkan 50 mL air dan 20 mL asam hidroklorida pekat, diaduk hingga larut dan dinginkan dengan es hingga suhu 15°C. Suhu dipertahankan pada lebih kurang 15°C. Dititrasi dengan larutan natrium nitrit 0,1 N (ujung buret ditempatkan dibawah permukaan larutan untuk menghindari oksidasi natrium nitrit oleh udara) hingga mencapai titik akhir titrasi. Titik akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna pada saat menggoreskan hasil titrasi ke pasta kanji iodida yang berubah menjadi biru. Dimana tiap mL natrium nitrit 0,1000 M setara dengan 17,22 mg sulfanilamida.

**3.4 Penetapan Kadar.** Sampel yang sudah di preparasi kemudian dititrasi dengan natrium nitrat 0,1 M. Saat mendekati titik akhir titrasi, ditambahkan titran tetes demi tetes sehingga segera terjadi warna biru, jika batang gelas yang dicelupkan digoreskan pada kertas kanji iodida akan membentuk warna biru. Titrasi selesai jika titik akhir dapat diulangi sesudah campuran didiamkan selama 1 menit.

## **E. Analisis Hasil**

Data yang didapat dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil uji laboratorium. Uji kualitatif dilakukan untuk mendeteksi adanya keberadaan sakarin dan siklamat dalam sampel. Sakarin diuji menggunakan metode reaksi warna dan KLT. Hasil positif reaksi warna ditandai dengan adanya warna ungu di larutan dan hasil positif dengan metode KLT ditandai dengan adanya bercak ungu muda dalam plat KLT dibawah sinar UV 254. Siklamat dilakukan dengan cara pengendapan dan perbandingan panjang gelombang antara baku dengan sampel. Hasil positif uji kualitatif siklamat dengan metode pengendapan ditandai dengan adanya endapan putih dalam larutan. Hasil positif metode

perbandingan panjang gelombang akan ditandai dengan panjang gelombang yang tidak berselisih jauh antara baku dengan sampel.

Apabila hasil uji kualitatif menunjukkan hasil yang positif, maka dilanjutkan dengan penetapan kadar sampel yang dilakukan dengan metode titrasi nitrimetri yang dinyatakan dalam satuan mg/kg. Hasil kadar dibandingkan dengan batas maksimum yang ditetapkan dalam Peraturan Kepala BPOM Nomor 11 Tahun 2019. Analisis ini bertujuan untuk menilai apakah kadar yang terdeteksi melebihi ambang batas aman yang diperbolehkan dalam pangan.