

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi adalah bagian yang berisi semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi dalam penelitian ini meliputi seluruh larutan gula dari produk es campur dan es cincau yang dijual di Kelurahan Plesungan, Karanganyar.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 2 sampel larutan gula dari es campur yang diambil dari 2 pedagang berbeda di Kelurahan Plesungan dan 1 sampel larutan gula dari es cincau.

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

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

Variabel utama dalam penelitian ini adalah keberadaan dan kadar pemanis buatan sakarin dan siklambat dalam larutan gula dari es campur dan es cincau..

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

Variabel dalam penelitian ini diklasifikasikan dalam tiga bentuk, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel larutan gula dari es campur dan es cincau. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar sakarin dan siklambat pada larutan gula dari es campur dan es cincau, yang menjadi titik pusat permasalahan yang akan diteliti. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kadar sakarin dan siklambat dalam sampel, seperti metode analisis yang digunakan, kondisi alat laboratorium, jenis pelarut, reagen pengujian, dan volume sampel yang diuji.

##### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Es campur adalah minuman tradisional yang terbuat dari campuran buah-buahan, es batu, sirup manis, susu, dan berbagai tambahan seperti buah dan agar-agar. Es cincau adalah minuman berbasis gel cincau dari tanaman *Cyclea barbata* atau *Mesona spp.* yang dicampur dengan pemanis dan cairan lainnya untuk menghasilkan rasa khas.

Sakarin adalah pemanis buatan sintetis dengan tingkat kemanisan 200–700 kali dibanding sukrosa, diuji secara kualitatif melalui reaksi warna dan kromatografi lapis tipis (KLT). Siklamat adalah pemanis buatan sintetis dengan tingkat kemanisan sekitar 30 kali dibanding sukrosa, diuji secara kualitatif dan kuantitatif. Kadar sakarin adalah keberadaan sakarin dalam sampel minuman yang ditentukan berdasarkan adanya warna ungu dalam reaksi kimia atau bercak pada KLT, tidak dinyatakan dalam satuan numerik. Kadar Siklamat adalah jumlah kandungan siklamat dalam sampel yang dinyatakan dalam mg/kg dan ditentukan secara kuantitatif melalui metode titrasi nitrimetri.

Titration adalah metode analisis kuantitatif untuk menentukan konsentrasi suatu zat dengan cara menambahkan larutan standar secara bertahap hingga tercapai titik akhir reaksi. Titrasi nitrimetri adalah salah satu jenis titrasi redoks yang menggunakan larutan natrium nitrit sebagai titran.

### **C. Bahan dan Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi spektrofotometri UV-VIS, corong pisah, buret 50 mL, mikro buret, statif, klem, pipet volume, pipet tetes, timbangan analitik ohaus, pipet *pump*, Erlenmeyer, gelas piala, labu tentukur, corong kaca, kertas saring, batang pengaduk, *hot plate*, vial, dan sudip.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain sampel minuman, baku murni natrium siklamat, akuades, es batu, asam klorida encer, asam klorida pekat, asam klorida 10%, barium klorida 10%, natrium nitrit 10%, natrium nitrit 0,1 M, asam sulfat 30%, asam sulfat 10%, asam sulfat pekat, etil asetat (pa), natrium sulfat anhidrat, natrium hidroksida 0,5 N, natrium hidroksida 5%, natrium hidroksida 10%, natrium hidroksida 10 N, natrium hipoklorit (pa), besi(III) klorida, eter, resorsinol, sikloheksana, natrium klorit 1%, kristal natrium nitrit, asam sulfanilat, sulfanilamida BPFI, dan pasta kanji iodida.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Preparasi Sampel**

Sampel berupa larutan gula dari es campur dan es cincau diperoleh langsung dari penjual di Desa Plesungan, Karanganyar. Peneliti meminta secara khusus bagian cair tanpa bahan padat, sehingga tidak diperlukan proses pemisahan tambahan di laboratorium.

### **2. Analisis Kualitatif Pemanis Buatan**

**2.1. Uji Kualitatif Sakarin dengan Reaksi warna.** Sekitar 100 mg sampel larutan gula dari es campur dan es cincau dilarutkan dalam 5 mL larutan natrium hidroksida (NaOH) 5%. Larutan tersebut diuapkan hingga kering, lalu residu yang tersisa dipanaskan dengan api kecil sampai tidak tercium lagi bau amonia. Setelah didinginkan, residu dilarutkan dalam 20 mL air dan dinetralkan menggunakan larutan asam hidroklorida (HCl) encer. Larutan tersebut disaring, kemudian satu tetes larutan besi(III) klorida ditambahkan ke dalam filtrat. Jika sampel mengandung sakarin, akan muncul warna ungu yang menandakan keberadaan senyawa tersebut (Kodeks Makanan Indonesia, 2018).

**2.2. Uji Kualitatif Sakarin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).** Sampel diasamkan sebanyak kurang lebih 50 mL menggunakan 5 mL asam sulfat 10%. Selanjutnya, dilakukan ekstraksi menggunakan 25 mL etil asetat dalam corong pemisah. Ekstrak yang diperoleh disaring melalui lapisan natrium sulfat anhidrat untuk menghilangkan air, kemudian diuapkan hingga volumenya tinggal 2 mL. Larutan standar ditotolkan pada plat KLT dengan jarak totolan 1–1,5 cm dari tepi lempeng. Lempeng kemudian direndam dalam bejana tertutup yang jenuh dengan uap fase gerak hingga mencapai batas 1,5 cm dari tepi lempeng. Lempeng dikeringkan dan disinari di bawah sinar ultraviolet selama 1 menit. Adanya warna total ungu menandakan adanya kandungan sakarin dalam sampel (SNI 01-2893-1994).

**2.3. Uji Kualitatif Siklamat dengan Metode Pengendapan.** Sebanyak 100 mL sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, lalu ditambahkan 10 mL larutan HCl 10% serta 10 mL larutan BaCl<sub>2</sub> 10%. Campuran tersebut didiamkan selama 30 menit sebelum disaring menggunakan kertas saring.

Hasil filtrasi tersebut ditambahkan dengan 10 mL larutan  $\text{NaNO}_2$  10% ditambahkan di ruang asam, kemudian dipanaskan di atas hot plate atau penangas air pada suhu sekitar  $125\text{--}130^\circ\text{C}$  selama 20–30 menit. Endapan putih yang terbentuk setelah proses pemanasan, menunjukkan adanya kandungan siklamat dalam sampel (SNI 01-2893-1994).

### **3. Uji Kualitatif Siklamat dengan Panjang Gelombang Maksimum**

**3.1. Uji Panjang Gelombang Baku Siklamat.** Larutan baku siklamat untuk analisis kualitatif disiapkan dengan menimbang sebanyak 50 mg siklamat, kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga volume 50 mL dalam labu takar, menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm (Maritha, 2021). Dari larutan tersebut, diambil sebanyak 3 mL dan diencerkan dengan aquadest hingga 50 mL, sehingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi 60 ppm. Larutan ini kemudian diperlakukan seperti larutan uji: dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan 1 mL larutan  $\text{NaOH}$  10 N dan 5 mL sikloheksan, lalu dikocok selama 1 menit.

Lapisan air yang terbentuk dipindahkan ke corong pisah kedua, ditambahkan 2,5 mL asam sulfat 30%, 5 mL sikloheksan, dan 5 mL larutan natrium hipoklorit, lalu dikocok selama 2 menit. Jika tidak muncul warna, ditambahkan lagi sekitar 5 mL larutan hipoklorit hingga terbentuk warna kuning kehijauan pada lapisan sikloheksan sebagai indikasi positif. Lapisan sikloheksan ini kemudian dicuci dengan 25 mL air, dipisahkan, dan bagian bawah dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL (Maritha, 2021). Larutan akhir ini selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200–400 nm untuk dibandingkan dengan sampel (Hernaningsih dan Jayadi, 2021).

**3.2. Uji Panjang Gelombang Sampel.** Sebanyak 50 mL sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam corong pisah pertama. Kemudian, ditambahkan 2,5 mL asam sulfat pekat dan dibiarkan hingga dingin. Sebanyak 50 mL etil asetat ditambahkan dan campuran dikocok selama 2 menit. Lapisan etil asetat yang terbentuk kemudian dipisahkan, dan sebanyak 40 mL bagian jernihnya dimasukkan ke dalam corong pisah kedua. Campuran tersebut dikocok dengan 15 mL air sebanyak tiga kali.

Lapisan air hasil pencucian dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam corong pisah ketiga.

Menambahkan ke dalam corong pisah ketiga 1 mL larutan NaOH 10 N dan 5 mL sikloheksan, lalu campuran dikocok selama 1 menit. Lapisan air yang terbentuk kemudian dipisahkan dan dimasukkan ke dalam corong pisah keempat. Sebanyak 2,5 mL asam sulfat 30%, 5 mL sikloheksan, dan 5 mL larutan natrium hipoklorit ditambahkan pada tahap ini, kemudian campuran dikocok selama 2 menit. Lapisan sikloheksan yang terbentuk biasanya akan menunjukkan warna kuning kehijauan. Jika warna belum terbentuk, larutan natrium hipoklorit dapat ditambahkan kembali sebanyak  $\pm 5$  mL.

Lapisan air dibuang dan 25 mL air ditambahkan ke dalam lapisan sikloheksan setelah terbentuk warna. Campuran dikocok kembali dan lapisan air dipisahkan. Lapisan bawah dari hasil akhir dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan digunakan sebagai larutan C (Rotinsulu, 2017). Absorbansi larutan tersebut kemudian diukur pada rentang panjang gelombang 200–400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Hernaningsih dan Jayadi, 2021).

#### **4. Analisis Kuantitatif Siklomat dengan Metode Titration Nitrimetri**

##### **4.1. Pembuatan larutan sekunder natrium nitrit 0,1M 300 mL.**

Menimbang 2,07 gram kristal natrium nitrit dan memasukkan ke dalam gelas beaker 300 mL. Menambahkan akuades hingga 300 ml dan dihomogenkan.

##### **4.2. Pembakuan natrium nitrit.**

Menimbang kurang lebih 500 mg sulfanilamida dan memasukkan ke dalam Erlenmeyer. Menambahkan 50 mL air dan 20 mL *asam hidroklorida* P hingga larut. Mendinginkan dengan es hingga suhu 15 °C. Suhu dipertahankan pada lebih kurang 15 °C. Melakukan titrasi dengan larutan natrium nitrit 0,1 M hingga mencapai titik akhir titrasi. Titik akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi warna biru kehijauan dan perubahan warna pada saat menggoreskan hasil titrasi ke pasta kanji iodida yang berubah menjadi biru.

##### **4.3. Penetapan Kadar Sampel.**

Ditimbang saksama sebanyak 4 g sampel, kemudian dilarutkan dalam campuran larutan 50 ml air dan 5 ml asam hidroklorida. Titrasi dilakukan menggunakan natrium nitrit 0,1 M LV. Ketika mendekati titik

akhir, titran ditambahkan secara bertahap hingga muncul warna biru saat batang gelas yang dicelupkan digoreskan pada kertas kanji iodida. Titik akhir juga dapat ditentukan secara elektrometrik. Titrasi selesai jika titik akhir dapat diulangi sesudah campuran didiamkan selama 1 menit.

#### **E. Analisis Hasil**

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil uji laboratorium. Analisis kualitatif dilakukan untuk mendeteksi keberadaan sakarin dan siklamat dalam sampel. Sakarin diuji menggunakan metode reaksi warna dan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil positif pada uji reaksi warna ditandai dengan munculnya warna ungu, sedangkan pada KLT ditandai dengan munculnya bercak ungu di bawah sinar ultraviolet 254 nm.

Siklamat diuji secara kualitatif menggunakan metode pengendapan, dengan indikator hasil positif berupa terbentuknya endapan putih. Sampel yang menunjukkan hasil positif kemudian dikonfirmasi melalui spektrofotometri UV-Vis dengan mengukur panjang gelombang maksimum sampel. Hasil pengukuran dibandingkan dengan panjang gelombang larutan baku siklamat yang diuji secara langsung di laboratorium. Kesesuaian nilai  $\lambda_{\text{maks}}$  antara sampel dan baku menjadi dasar untuk mengidentifikasi keberadaan siklamat.

Analisis kuantitatif terhadap kadar siklamat dilakukan menggunakan metode titrasi nitrimetri. Hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan mg/kg dan dibandingkan dengan batas maksimum penggunaan natrium siklamat sebesar 500 mg/kg sesuai dengan Peraturan Kepala BPOM Nomor 11 Tahun 2019. Analisis ini bertujuan untuk menilai apakah kadar yang terdeteksi melebihi ambang batas maksimum yang diperbolehkan dalam pangan.