

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan subjek keseluruhan yang ada dalam penelitian. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental pada 3 depot air minum isi ulang di Kelurahan Mojosongo.

2. Sampel

Sampel yaitu bagian terkecil dari seluruh bagian objek pada penelitian. Metode sampling yang digunakan pada penelitian ini yaitu *purposive sampling*. *Purposive sampling* yaitu sampel diambil tidak secara acak, tetapi kriteria subjek ditentukan oleh peneliti (Ramadhan, 2021).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah sampel air minum isi ulang dari 3 depot air minum yang ada di Kelurahan Mojosongo.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah validasi metode kadar nitrit dalam air dengan seri konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v senyawa pengkupling α -nafthilamin.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah analisis kualitatif pada sampel air minum isi ulang dilanjutkan penetapan kadar dengan metode spektrofotometri Uv-Vis.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi selanjutnya dapat diklasifikasi menjadi 3 variabel berdasarkan hubungan sebab-akibat, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali.

Variabel bebas, yaitu variabel yang direncanakan akan diteliti pengaruhnya variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi sampel air minum isi ulang dari 3 depot air minum isi ulang di Kelurahan Mojosongo.

Variabel Tergantung, yaitu titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar nitrit pada air minum isi ulang dengan metode Spektrofotometri Uv-Vis

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralkan atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, pembuatan larutan standar nitrit, pembuatan larutan seri konsentrasi α -naphthilamin.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Pembuatan larutan induk nitrit 250 ppm sebanyak 1000 ml. dilanjutkan pembuatan larutan intermediet nitrit 5 ppm sebanyak 50 ml

Kedua, Pembuatan larutan standar nitrit ($N-NO_2$) 0,1 ppm; 0,15 ppm; 0,2 ppm; 0,25 ppm; 0,3 ppm dan 0,35 ppm sebanyak 10 ml.

Ketiga, Pembuatan larutan pereaksi asam sulfanilat 1% b/v.

Keempat, Pembuatan larutan pereaksi α -naphthilamin dengan seri konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v dalam etanol 95%.

Kelima, validasi metode analisis adalah penilaian parameter tertentu untuk mengetahui metode spektrofotometri UV-Vis sesuai untuk membuktikan metode tersebut memenuhi syarat penggunaan dengan memperhatikan parameter linearitas, akurasi, presisi, sensitifitas, batas deteksi (LOD), dan batas kuantitasi (LOQ).

Keenam, Analisis kualitatif dan kuantitatif kadar nitrit pada sampel air minum isi ulang.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer (Shimadzu UV-1800), Neraca Analitik (AND GR-200), Labu Ukur, Bekker Gelas, Erlenmeyer, Pipet Volume, Pipet Ukur.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dari bahan kimia dengan derajat kemurnian *pro analis* (pa). Natrium Nitrit, Asam Sulfanilat, α -naphthilamin, HCl pekat, etanol 95%, Aquabidest dan 3 sampel air minum isi ulang.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan larutan induk nitrit (N-NO₂) 250 ppm sebanyak 1000 ml

Serbuk Natrium Nitrit ditimbang sebanyak 1,232 gram, kemudian dimasukkan dalam gelas beaker dan tambahkan aquabidest sedikit demi sedikit ad homogen. Pindahkan dalam labu ukur 1000 ml dan ditepatkan sampai tanda dengan pipet tetes (SNI 06-6989.9-2004).

2. Pembuatan larutan intermediat nitrit (N-NO₂) 5 ppm sebanyak 50 ml

Larutan induk nitrit dipipet dengan pipet volume 1 ml, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 ml sambil ditambahkan aquabidest sedikit demi sedikit sambil dikocok. Ditepatkan sampai tanda batas. (Diarti *et al*, 2015).

3. Pembuatan larutan standar nitrit (N-NO₂) 0,1 ppm; 0,15 ppm; 0,2 ppm; 0,25 ppm; 0,3 ppm; dan 0,35 ppm

Larutan intermediat nitrit (N-NO₂) dipipet dengan pipet volume masing-masing 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml dan 0,7 ml kemudian masukkan pada labu ukur 10 ml yang berbeda untuk pembuatan larutan standar 0,1 ppm, 0,15 ppm, 0,2 ppm, 0,25 ppm, 0,3 ppm dan 0,35 ppm. Kemudian masing-masing ditambahkan aquabidest sedikit demi sedikit sambil dikocok. Tepatkan sampai tanda dengan pipet tetes (Diarti *et al*, 2015).

4. Pembuatan larutan pereaksi asam sulfanilat 1 % b/v

Asam sulfanilat ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian dimasukkan dalam beaker glass yang telah disiapkan. Tambahkan 20 ml aquabidest dan 10 ml HCl pekat, kemudian aduk sampai asam sulfanilat larut, bila sudah larut tambahkan aquabidest sampai 100 ml. kemudian pindahkan ke dalam botol yang telah disiapkan (Diarti *et al*, 2015).

5. Pembuatan larutan pereaksi α -nafthilamin dengan seri konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v dalam etanol 95%

α -nafthilamin ditimbang masing-masing sebanyak 500 mg, 600 mg, 700 mg untuk pembuatan seri konsentrasi 0,5 % b/v, 0,6 % b/v dan 0,7 % b/v kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass yang berbeda. Masing-masing ditambahkan etanol 95 % sedikit demi sedikit hingga larut. Kemudian dimasukkan masing – masing ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan etanol 95% sampai batas. Dipindahkan dalam botol gelap yang telah disiapkan (Diarti *et al*, 2015).

6. Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum

Larutan standart nitrit 0,1 ppm sebanyak 2 ml ditambah 2 ml larutan asam sulfanilat ditambah 2 ml larutan pereaksi α -nafthilamin dengan variasi konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v pada tabung reaksi, diukur absorbansi dengan variasi panjang gelombang 400-800 nm sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum (Nurjanah, 2017).

7. Penentuan Operating Time

Larutan standart nitrit 0,1 ppm sebanyak 2 ml ditambah 2 ml larutan asam sulfanilat ditambah 2 ml larutan pereaksi α -nafthilamin dengan variasi konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v pada tabung reaksi, selanjutnya di baca pada panjang gelombang maksimum pada interval 1 – 10 menit (Nurjanah, 2017).

8. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Nitrit Untuk Penentuan Linearitas, LOD & LOD, Dan Sensitifitas

Spektrofotometer dioptimalkan sesuai petunjuk penggunaan alat. Kemudian dipipet 2 ml larutan standar nitrit dengan konsentrasi 0,1 ppm, 0,15 ppm, 0,2 ppm, 0,25 ppm 0,3 ppm, dan 0,35 ppm, kemudian tambahkan 2 ml larutan asam sulfanilat dan didiamkan 2-8 menit. Ditambah 2 ml larutan pereaksi α -nafthilamin dengan variasi konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v yang akan diukur absorbansinya, dimasukkan dalam tabung reaksi. Didiamkan selama operating time dan segera lakukan pengukuran absorbansi (pengukuran tidak boleh dilakukan lebih dari 1 jam). Diukur absorbansinya pada spektrofotometri selama *operating time* pada panjang gelombang maksimum (Diarti *et al*, 2015; Lestari *et al*, 2011).

Data yang didapat dipergunakan untuk menentukan nilai parameter validasi sebagai berikut:

8.1. Penentuan Linearitas

Linearitas didapat dari hasil pembuatan kurva standar antara konsentrasi dengan absorbansi. Konsentrasi larutan standar dinyatakan dalam x dan absorbansi dinyatakan dalam y. Dari kurva tersebut dibuat persamaan regresinya, sehingga diperoleh persamaan berikut :

$$y = a + bx$$

Keterangan:

b = Slope

a = Intercept

y = Nilai absorban pada sumbu y

x = Kadar larutan standar pada sumbu x

Berdasarkan kurva tersebut didapatkan nilai *koefisien korelasi* (r).

8.2. Penentuan LOD dan LOQ

Batas deteksi dan batas kuantitas dapat dihitung secara statistika melalui persamaan garis linear dari kurva baku. Nilai pengukuran akan sama dengan b pada persamaan garis linear $y = bx + a$, sedangkan simpangan baku residual (Sy/x) (Lestari dkk, 2011). Untuk menentukan nilai LoD dan LoQ pertama-tama kita harus menghitung nilai absorbansi hitung ($\hat{y}$) yang didapat dari substitusi nilai x pada persamaan regresi garis linear $y = bx + a$. Selanjutnya dicari nilai (Simpangan baku terhadap blanko) dengan persamaan :

$$S_b = \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{N-2}$$

Keterangan:

S_b = Simpangan baku terhadap blanko

$\hat{Y}$ = nilai absorbansi hitung, yaitu nilai y yang didapat dengan substitusi masing-masing nilai x ke dalam persamaan garis linear $y = bx + a$

y_i = nilai absorbansi pengukuran, yaitu nilai y masing-masing konsentrasi (x).

n = jumlah standar nitrit yang digunakan.

Dicari LoD dan LoQ dengan persamaan

$$LOD = \frac{3xS_b}{b}$$

$$LOQ = \frac{10xS_b}{b}$$

Keterangan :

LoD : Batas Deteksi

LoQ : Batas Kuantitas

b : nilai *slope* (b) pada persamaan regresi garis linear $y = bx + a$.

8.3. Penentuan Sensitifitas

Sensitifitas ditentukan dari harga *slope* (b) yang berasal dari regresi linier kurva standar $y = bx + a$.

9. Penentuan Presisi

Larutan baku Nitrit dengan konsentrasi 0.2 ppm, diambil 2 ml sebanyak enam kali, dimasukkan dalam enam tabung reaksi dan masing-masing ditambahkan 2 ml larutan asam sulfanilat ditambah 2 ml larutan pereaksi α -naphthilamin dengan variasi konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v. Larutan dibiarkan selama *operating time* dan di baca pada panjang gelombang maksimum (Harmita, 2004). Kemudian dihitung nilai RSD (Lestari *et al*, 2011).

Berdasarkan data diatas dapat dicari nilai standar deviasi (SD) dengan cara:

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

Keterangan :

n : jumlah replikasi

Selanjutnya presisi dihitung sebagai simpangan baku relative (RSD) atau koefisien variasi (KV), ditentukan dengan cara :

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

10. Penentuan Akurasi (% recovery)

Larutan baku Nitrit dengan konsentrasi 0,15 ppm, 0,2 ppm, dan 0,25 ppm diambil sebanyak 2 ml, masukkan dalam tabung reaksi yang telah disiapkan. Kemudian tambahkan 2 ml larutan asam sulfanilat, dikocok, dan didiamkan 2-8 menit. Setelah itu tambahkan 2 ml larutan pereaksi α -nafthilamin dengan variasi konsentrasi 0,5% b/v, 0,6% b/v dan 0,7% b/v, ditentukan konsentrasi pada spektrofotometer pada *operating time* dan panjang gelombang maksimum dikocok dan segera lakukan pengukuran absorbansi (pembacaan jangan ditunda lebih dari 1 jam). Perlakuan direplikasi 3 kali (Diarti *et al.*, 2015 ; Lestari *et al.*, 2011).

Untuk menentukan nilai akurasi metode yang dinyatakan sebagai persen recovery ditentukan dengan rumus :

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Kadar pembacaan}}{\text{Kadar sebenarnya}} \times 100\%$$

11. Analisa Kualitatif Pada Sampel Air Minum

Analisa kualitatif nitrit dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 2 ml ditambahkan 2 ml larutan asam sulfanilat dibiarkan bereaksi selama 2-8 menit, kemudian ditambahkan 2 ml α -nafthilamin terbentuk warna merah keunguan (Diarti *et al.*, 2015).

12. Analisa Kuantitatif Pada Sampel Air Minum

Penetapan kadar nitrit dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 2 ml sampel air minum kemudian ditambahkan 2 ml larutan asam sulfanilat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dibiarkan bereaksi selama 2-8 menit, kemudian ditambahkan 2 ml larutan α -nafthilamin. Dibiarkan selama *operating time* dan dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum (Diarti *et al.*, 2015).

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan uji statistik One way Anova. Kemudian dilanjutkan dengan menentukan validasi metode menggunakan spektrofotometri dengan parameter menghitung linieritas, LoD & LoQ, presisi, sensitifitas, dan akurasi. Sampel air minum dilakukan analisis secara kualitatif untuk mengetahui keberadaan nitrit dan analisis lanjutan dengan spektrofotometri Uv-Vis dilakukan dengan pengukuran pada panjang gelombang maksimum pada sampel air minum digunakan untuk menetapkan kadar nitrit pada air minum. Absorbansi yang di dapat dari data kurva baku dihitung dengan metode regresi linear, sehingga diperoleh persamaan $y=a+bx$. Penetapan kadar nitrit pada air minum isi ulang dilakukan dengan rumus ppm.