

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah purposive sampling yang bertujuan mengetahui berapa kadar yang ada pada biji kluwak. Tahapan penelitian dimulai dari persiapan sampel sampai penetapan kadar sianida menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Analisis Makanan dan minuman, dan Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Waktu

Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Juni-Juli 2024

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kluwak dari pedagang di Pasar Mojosongo, kelurahan Mojosongo, kecamatan Jebres, Kota Surakarta, Provinsi Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah biji kluwak. Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara *purpose sampling*. *Purpose sampling* yaitu teknik pengambilan sampel yang didasarkan pada peneliti tentang sampel yang akan dipilih.

D. Alat, Bahan dan Perekasi

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah timbangan analitik, palu, gelas beaker, spatel logam, tabung reaksi, kertas saring whatman, kertas timbang, pipet tetes, erlenmayer, labu takar, labu ukur, batang pengaduk, corong, stopwatch, penjepit tabung, mortar stamper dan spektrofotometer uv-Vis .

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah daging biji kluwak yang telah dihaluskan dan disaring kemudian diambil filtratnya.

3. Pereaksi

Pereaksi yang digunakan dalam penelitian adalah aquadest, FeCl_3 , AgNO_3 , Etanol 90%, Natrium Karbonat (Na_2CO_3) 5%, Ninhydrin 1%, Natrium Hidroksida (NaOH) dan Larutan Induk Sianida (KCN)

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Sampel

a. Pengumpulan sampel

- 1) Buah kluwak yang telah matang diambil bijinya, kriteria biji kluwak permukaan kulit kasar pericarp setebal 6-10 mm dan belum berlubang
- 2) Dikupas biji kluwak untuk melepaskan daging biji dari cangkangnya.

b. Preparasi sampel

Daging biji kluwak yang telah didapatkan kemudian dihaluskan menggunakan mortir. Setelah halus, sebanyak 25 gram biji kluwak *add* dengan etanol 90% ke dalam labu ukur 250 mL dan saring dengan kertas saring whatman.

2. Analisis Kadar Sianida

a. Analisis Kualitatif

Penentuan keberadaan senyawa sianida didalam sampel dilakukan melalui identifikasi kualitatif yang mengandalkan pembentukan presipitat (endapan) setelah sampel melewati fase pemanasan terkontrol. Keberadaan ion sianida dinyatakan positif apabila muncul reaksi fisik berupa pembentukan endapan jingga pada pengujian dengan larutan FeCl_3 , serta munculnya endapan berwarna putih saat direaksikan dengan AgNO_3 .

Secara teknis, protokol laboratorium ini dijalankan melalui langkah-langkah berikut:

- Persiapan media uji: Sebanyak 1 ml filtrat dari sampel dibagi ke dalam dua tabung reaksi yang berbeda secara merata.
- Aktivasi melalui suhu: Kedua tabung tersebut diproses dalam penangas air mendidih selama durasi 10 hingga 15 menit untuk memicu reaktivitas kimiawi.
- Penambahan reagen spesifik: Setelah pemanasan, tabung pertama ditetesi dengan 1-2 tetes larutan FeCl_3 , sementara tabung kedua diberikan 1-2 tetes AgNO_3 . Perubahan warna dan pembentukan padatan pada dasar tabung menjadi dasar penarikan kesimpulan mengenai kandungan sianida dalam sampel tersebut.

b. Analisis Kuantitatif

3. Pembuatan Larutan Standar

- a. Penyiapan larutan stok sianida (CN) 1000 ppm preparasi larutan induk sianida dengan kadar 1000 ppm dilakukan dengan melarutkan 0,625 gram kristal KCN (BM = 65) ke dalam akuades hingga volume total mencapai 250 ml. Larutan primer ini kemudian menjadi basis untuk pembuatan larutan standar melalui prosedur pengenceran bertahap guna memperoleh konsentrasi 10 ppm, yang selanjutnya diencerkan kembali ke rentang yang lebih rendah yaitu 0,02 ppm, 0,03 ppm, 0,04 ppm, 0,05 ppm, dan 0,06 ppm. Rincian teknis mengenai tahapan pembuatan larutan ini tersedia pada lampiran .
- b. Formulasi larutan ninhidrin 1%, sebanyak 1 gram kristal ninhidrin dilarutkan menggunakan akuades ke dalam labu ukur berkapasitas 100 ml hingga mencapai tanda batas yang ditentukan.
- c. Preparasi larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 5%, dilakukan dengan melarutkan 5 gram kristal Na_2CO_3 ke dalam akuades menggunakan bantuan labu ukur 100 ml sampai volume akhir terpenuhi.
- d. Sintesis larutan natrium hidroksida (NaOH) 2,5 M. Larutan natrium hidroksida dengan molaritas 2,5 M disiapkan melalui pelarutan 50 gram kristal NaOH (BM = 40) ke dalam akuades. Proses ini dilakukan menggunakan beaker

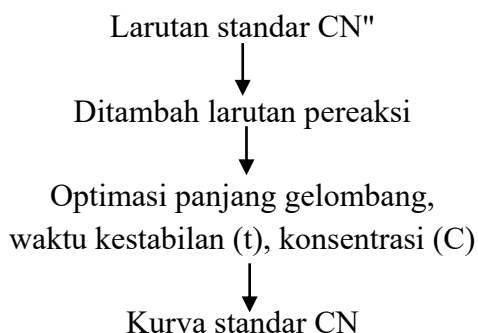
glass berkapasitas 500 ml dengan menambahkan pelarut hingga mencapai tanda batas volume.

4. Penentuan Optimasi Sianida (CN)

a. Penentuan *Operating Time* (OT)

Prinsip dasar identifikasi sianida menggunakan reagen ninhidrin terletak pada pembentukan senyawa antara hidrindantin yang mengalami transformasi warna secara bertahap sesuai dengan kondisi pH lingkungan. Sebagaimana dijelaskan oleh (Rahayu, 2003), interaksi antara ninhidrin (I) dan sianida dalam matriks air yang netral awalnya membentuk hidrindantin tanpa warna (II). Namun, kehadiran natrium karbonat (Na_2CO_3) memicu manifestasi kromoforik menjadi merah tua yang stabil (III). Warna ini kemudian dapat bertransformasi menjadi biru tua (IV dan V) saat ditambahkan natrium hidroksida (NaOH) dalam media air, yang merepresentasikan dua bentuk anion berbeda dari ninhidrin. Dalam mekanisme ini, ion sianida berperan vital sebagai agen katalitik dasar yang bersifat spesifik.

Penentuan waktu kerja (*operating time*) dilakukan dengan memantau fluktuasi nilai absorbansi dari campuran reaksi yang terdiri atas KCN, ninhidrin, Na_2CO_3 , dan NaOH . Monitoring fotometrik ini dimulai sejak saat seluruh reagen berinteraksi hingga sistem mencapai titik ekuilibrium atau kondisi di mana nilai absorbansi menunjukkan angka yang stabil dan tidak lagi mengalami perubahan signifikan. Fase kestabilan inilah yang kemudian ditetapkan sebagai durasi optimal untuk melakukan pengukuran pada sampel penelitian.



Gambar 3. 1 Penetapan operating time

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Berdasarkan hasil pemindaian spektrum pada rentang cahaya tampak, titik puncak serapan atau panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\max}$) untuk kompleks sianida-ninhidrin ditetapkan pada angka 597 nm. Penentuan titik ini sangat krusial dalam analisis kuantitatif karena sensitivitas instrumen terhadap fluktuasi konsentrasi berada pada tingkat paling optimal saat pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan. Ini memungkinkan deteksi perubahan kadar analit yang lebih presisi dibandingkan pada titik panjang gelombang lainnya.

Secara teknis, prosedur pencarian titik optimum ini melibatkan penggunaan larutan standar sianida dengan konsentrasi 40 ppm. Proses dimulai dengan mereaksikan analit bersama Na_2CO_3 5%, yang kemudian dikomplekskan dengan penambahan ninhidrin 1%. Untuk menjamin homogenitas dan stabilitas warna, larutan diberikan perlakuan mekanis (digojog) dan ditambahkan NaOH 2,5 M sebelum dilakukan pengukuran absorbansi pada rentang spektrum antara 400 hingga 800 nm menggunakan perangkat Spektrofotometer UV-Vis. Optimasi ini didasarkan pada prinsip bahwa setiap spesies kimia berkromofor memiliki profil atenuasi radiasi yang unik dan spesifik pada panjang gelombang tertentu sesuai dengan karakteristik warnanya. Dengan mengunci pengukuran pada titik serapan tertinggi, integritas data serta linearitas antara konsentrasi dan absorbansi dapat terjaga dengan lebih baik.

c. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dalam menentukan kurva kalibrasi digunakan larutan CN 40 ppm yang diencerkan menjadi 1 ppm dengan dipipet 1,005 ml larutan 40 ppm kedalam labu takar 50 ml ditambah aquadest sampai tanda batas dan homogenkan. Untuk membuat kurva kalibrasi dibuat larutan standar CN 0,2 ppm, 0,3 ppm, 0,4 ppm, 0,5 ppm, 0,6 ppm dimasukan dalam labu ukur 10 ml dengan penambahan NaOH 2,5 M. Pertama di ambil 4 ml larutan CN pada masing-masing konsentrasi, kemudian ditambahkan 1,6 ml ninhydrin 1% dan 1,6 ml Na_2CO_3 5%. Larutan didiamkan selama 30 menit kemudian ditambahkan NaOH 2,5 M sampai batas labu ukur 10 ml. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 597 nm pada saat senyawa yang terbentuk sudah stabil. Hasil absorbansi yang diperoleh digunakan dibuat grafik absorbansi konsentrasi. Hasil absorbansi dicantumkan pada lampiran 2.

d. Penetapan Kadar Sianida (CN) pada Biji Kluwak

Penentuan konsentrasi analit dalam sampel dilakukan melalui prosedur pengukuran absorbansi yang dijalankan secara triplo (tiga kali pengulangan) untuk menjamin reliabilitas data. Nilai absorbansi yang terdeteksi pada panjang gelombang 597 nm tersebut kemudian dikomparasikan dengan kurva kalibrasi standar guna memperoleh hasil kuantitatif yang akurat. Tahapan awal dimulai dengan 10 g daging biji kluwak yang dihaluskan kemudian disaring dan diambil filtratnya 1 ml diencerkan 1000 kali pengenceran. Dari larutan sampel yang telah diencerkan 1000 kali diambil 4 ml dimasukkan dalam labu ukur 10 ml kemudian ditambahkan 1,6 ml ninhydrin 1% dan 1,6 ml Na_2CO_3 5% sampai timbul warna merah. Larutan didiamkan selama 30 menit. Kemudian ditambahkan NaOH 2,5 M timbul warna biru didiamkan selama 30 menit. Hasil absorbansi dibandingkan dengan absorbansi kurva kalibrasi. Langkah ini diulangi untuk 3 buah larutan.

e. Teknik Pengumpulan Data

Kuantifikasi kadar sianida dalam sampel daging biji kluwak dilakukan melalui pendekatan integratif yang

menggabungkan verifikasi awal dan analisis instrumen presisi. Fokus utama metodologi ini terletak pada ekstrapolasi konsentrasi analit (dalam satuan mg/100g) berdasarkan model regresi linear. Nilai absorbansi sampel yang terdeteksi melalui pembacaan Spektrofotometer UV-Vis diproses sebagai variabel dependen, yang kemudian dihitung menggunakan koefisien regresi (a dan b) untuk mendapatkan data kadar yang akurat dan valid.

Secara prosedural, rangkaian pengumpulan data diawali dengan pengujian kualitatif menggunakan reagen FeCl_3 dan AgNO_3 untuk memastikan kehadiran senyawa sianida secara makroskopis. Setelah presensi analit terkonfirmasi, dilakukan analisis kuantitatif secara mendalam menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis. Seluruh temuan yang diperoleh dari perhitungan matematis dan observasi laboratorium tersebut kemudian disajikan dalam bentuk representasi grafis guna mempermudah interpretasi data dan perbandingan hasil penelitian.

Regresi linier: $y = bx - a$

Keterangan:

y = serapan yang diperoleh

a = konstanta

b = koefisien regresi (kemiringan)

x = konsentrasi