

BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas, spatel, batang pengaduk, mikropipet, tip, timbangan analitik (Mettler Toledo), botol kaca bening atau wadah, Spektrofotometri UV-Vis, sonikator, pH meter, seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu LC 20AD) dengan kolom C18 (250 × 4,6 mmL).

2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi buah jambu biji merah, kiwi, dan lemon, Vitamin C baku (PT. Dipa Pharmalabs), aquabidest pro injeksi (API), aquadest, metanol pro KCKT, dan asam asetat (100%, Emsure)

4.2. Prosedur Kerja

4.2.1. Pembuatan Larutan Baku Vitamin C 1000 µg/mL

Ditimbang Vitamin C baku 50 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu dilarutkan 50 mL larutan aquabidest dan didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 µg/mL

4.2.2. Pembuatan Larutan *Intermediate* Vitamin C 100 µg/mL

Larutan Baku Vitamin C dipipet sebanyak 5,0 mL dilarutkan 50 mL larutan aquabidest dan didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 µg/mL

4.2.3. Pengambilan Sampel

Sampel berupa buah jambu biji merah, kiwi, dan lemon dimana buah Jambu Biji diambil dari toko buah sedangkan Kiwi dan Lemon dari supermarket, buah yang sudah dibeli langsung dibuat sediaan *infused water*. Kriteria pengambilan sampel buah yang segar sebagai berikut

Tabel 4. 1 Kriteria Sampel

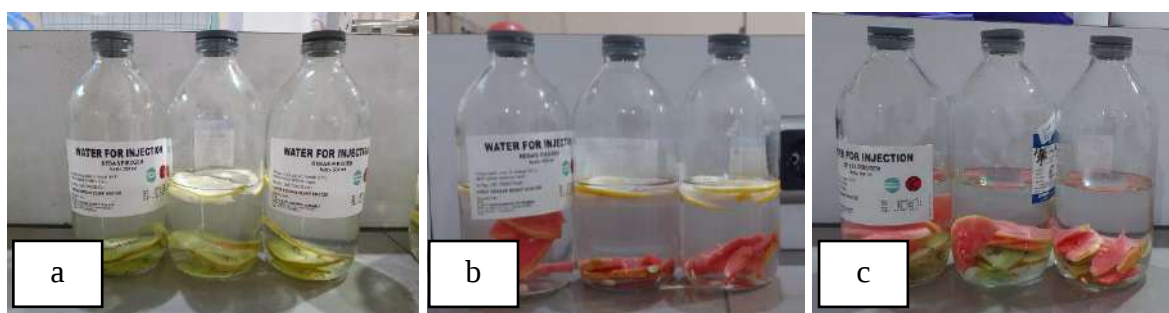
Buah		Kriteria sampel			
		Bau	Warna	Tekstur	Ukuran
Jambu Merah	Biji	Manis dan harum khas	Kuning kehijauan	Permukaannya halus dan empuk merata	Sama besar
Kiwi		Manis	Kulit cokelat tua	Empuk merata	Lonjong
Lemon		Asam segar	Kuning cerah	Permukaannya halus dan tidak ada bercak, dan empuk	Lebih bundar dan memanjang

4.2.4. Pembuatan *Infused water* Vitamin C

Masing-masing buah yaitu Jambu Biji, Kiwi, dan Lemon dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada kulit buah lalu dipotong menjadi bagian kecil kemudian ditimbang sebanyak 15 gram untuk masing-masing buah (Putri et al., 2020), setelah itu dimasukan ke dalam wadah atau botol kaca bening diisi dengan aquabidest sebanyak 250 mL (Devianti & Arifiyana, 2022) kemudian wadah ditutup rapat dan direndam dengan suhu ruang selama waktu tertentu yaitu 1 dan 3jam (Kartikawati & Yudi, 2020) (Trisnawati et al., 2019).

Tabel 4. 2 Kombinasi Buah

No	Kombinasi buah	Perbandingan kombinasi buah dan Aquabidest
1	Lemon dan Kiwi	15 gram:15 gram:250 mL
2	Lemon dan Jambu Biji Merah	15 gram:15 gram:250 mL
3	Kiwi dan Jambu Biji Merah	15 gram:15 gram:250 mL



Gambar 4. 1. larutan *infused water* dari kombinasi lemon dan kiwi (a), lemon dan jambu biji merah (b), kiwi dan jambu biji merah (c)

4.2.5. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum Vitamin C

Panjang gelombang serapan maksimum ($\lambda_{\max}$) larutan baku Vitamin C 10 $\mu\text{g/mL}$ diukur pada rentang 200-400 nm menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

4.2.6. Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Dilakukan Uji Kesesuaian Sistem untuk mengetahui kondisi optimal dari KCKT pada penetapan kadar Vitamin C dalam *Infused water*. Dipilih kondisi optimal KCKT dengan detektor UV diatur sesuai pada panjang gelombang maksimum, fase diam C18, fase gerak terdiri dari metanol dan asam asetat serta volume penyuntikan 20 μL . UKS dilakukan terhadap larutan sampel (*infused water*) dan larutan baku. Pada komposisi fase gerak dan laju alir diatur hingga sesuai dengan parameter sebagai berikut

Tabel 4. 3 Parameter UKS

Parameter	Rumus	Syarat
Faktor kapasitas (k')	$k' = \frac{(tR - tM)}{tM}$	
	Keterangan: k' : Faktor kapasitas tR : Waktu retensi solute tM : Waktu retensi fase gerak	1,0 – 10
Resolusi (R_s)	$R_s = \frac{2\Delta tR}{(W1 + W2)}$	
	Keterangan: R_s : Resolusi tR : Waktu retensi W : Lebar puncak	>2
Simpangan Baku Relatif (SBR)	$\% SBR = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$	
	Keterangan: SBR : Simpangan Baku Relatif SD : <i>Standar Deviation</i> $\bar{x}$: Kadar rata-rata sampel	<2%
Lempeng teoritis (N)	$N = 16 \left(\frac{tR}{Wb} \right)^2$	
	Keterangan: N : Lempeng teoritis tR : Waktu retensi solute Wb : Lebar dasar puncak	>2000
<i>Tailing factor</i> (Tf)	$TF = \frac{AB}{2AC}$	
	Keterangan: TF : <i>Tailing factor</i> AB : Jarak dari kedua kaki <i>peak</i> AC : Jarak dari <i>peak</i> maksimum ke kaki kanan <i>peak</i>	<2

Tabel 4. 4 Sistem Kromatografi

Sistem Kromatografi	
Detektor	UV
Fase diam	C18 (250 × 4,6 mmL)
Fase gerak	Metanol dan asam asetat 0,5% pH 3,0
Volume injeksi	20 µL

4.2.7. Validasi Metode Analisis

1. Uji Spesifisitas

Dilakukan spesifisitas untuk membuktikan dalam sampel dan larutan baku terdapat Vitamin C. Diambil larutan *intermediate* 100 µg/mL kemudian dipipet sebanyak 1,0 mL dilarutkan dengan 10 mL larutan aquabidest didapatkan konsentrasi 10 µg/mL. Larutan sampel *infused water* disaring dengan kertas Whatman masing-masing dipipet sebanyak 1,0 mL dilarutkan dengan 10 mL larutan aquabidest dalam labu ukur 10 mL kemudian dilakukan pengukuran pada larutan spike (baku ditambahkan sampel), dan pelarut aquabidest. Masing-masing larutan disaring *membrane filter* 0,45 µm dan dilakukan 3 kali pengulangan lalu diinjeksikan ke KCKT kemudian dibandingkan waktu retensinya (tR).

2. Uji Linieritas

Pengujian linieritas menggunakan larutan *intermediate* dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 µg/mL (dipipet masing-masing 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL, dan 1,0 mL) dalam labu ukur 10 mL lalu masing larutan disaring menggunakan *membrane filter* 0,45 µm dan diinjeksikan ke KCKT. Didapatkan kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi larutan standar dengan luas area (AUC), dan ditentukan persamaan regresi linier $y = bx + a$ beserta nilai koefisien korelasi (r), syarat nilai $r \geq 0,99$ dan syarat nilai $V_{x0} \leq 5\%$.

$$r = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{\sqrt{(n \sum X^2 - (\sum X)^2)(n \sum Y^2 - (\sum Y)^2)}}$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b}$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan: V_{x0} : Koefisien variasi fungsi

$\bar{x}$: Kadar rata-rata sampel

3. Uji Sensitifitas (Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi)

Persamaan untuk mencari nilai batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dihitung dari data kurva kalibrasi kemudian hasilnya dimasukkan dalam rumus

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y - y')^2}{n - 2}}$$

Keterangan: Nilai y' diambil dari $y = a + bx$

$$\text{Batas Deteksi (BD)} = \frac{3 S_y}{b}$$

$$\text{Batas Kuantifikasi (BK)} = \frac{10 S_y}{b}$$

Keterangan: b (slope) diambil dari $y = a + bx$

4. Uji Perolehan Kembali (Akurasi dan Presisi)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan parameter standar adisi yaitu sampel yang dianalisis ditambahkan larutan standar Vitamin C yang sudah diketahui konsentrasinya. Untuk mengukur akurasi dibuat dengan 3 sampel konsentrasi dilakukan masing-masing 3 kali pengulangan dengan cara dipipet sebanyak 0,32 mL, 0,4 mL, 0,48 mL dari larutan *intermediate* lalu ditambahkan larutan sampel untuk masing-masing 1,0 mL kemudian tambahkan aquabidest sampai 10 mL. Akurasi untuk melihat efektifitas metode pemisahan dari preparasi sampel, dimana % *recovery* dijadikan sebagai faktor koreksi dengan syarat nilai % *recovery* 90-107% (Harmita, 2004).

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar standar}} \times 100\%$$

$$\text{faktor koreksi} = \frac{1}{\% \text{ recovery}}$$

Parameter untuk mengukur presisi menggunakan standar adisi yaitu ditambahkan larutan filtrat dari sampel sebanyak 1,0 mL dan baku 5,0 mL dilarutkan aquabidest 10 mL hingga tanda batas setelah itu dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali, dimana masing-masing larutan disaring *membrane filter* 0,45 μm lalu diinjekan ke dalam KCKT.

4.2.8. Penetapan Kadar Vitamin C dalam *Infused water*

Masing-masing sampel *infused water* diambil 1,0 mL kemudian dimasukan ke dalam labu ukur tambahkan aquidest 10 mL setelah itu disaring dengan kertas Whatman, disaring kembali dengan *membrane filter* 0,45 μm lalu diinjeksikan ke KCKT sebanyak 20 μL dan diukur sebanyak 3 kali pengulangan.