

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan metode kualitatif yang bertujuan untuk menciptakan fase gerak yang optimal pada Rodhamin B menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Waktu yang digunakan peneliti untuk penelitian ini dilaksanakan sejak tanggal dikeluarkannya izin penelitian pada tanggal 8 Januari hingga 29 Januari 2024

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Gelas Ukur 50 mL, Pipet Tetes, Pipet Ukur 10 mL, Batang Pengaduk, Gelas Kimia 50 mL, Gelas Kimia 250 mL, Gelas Kimia 500 ml Pipa Kapiler, Pinset, Cawan penguap, Termometer, Hotplate, Oven, Cutter, Penggaris, Pencil

3.3.2 Bahan

Amonia 25%, Asam Asetat Glisial, Aseton, Plat KLT Silika Gel, Rhodamin B standart 1%, Mhetanil yellow, n-Butanol, n-Heksana

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang nilainya mempengaruhi variabel lainnya. Pada penelitian ini variabel bebasnya adalah fase gerak yang dikembangkan (Aseton : n-Heksana : Ammonia 25%).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai Rf dari pengembangan fase gerak sama dengan nilai Rf pewarna Rhodamine B pada SNI 01- 2895-1992.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Metode	Hasil Ukur
Fase gerak Rhodamine B	Larutan umpan (feed) untuk melewati fase diam (adsorbent) yang akan menentukan terjadinya pemisahan suatu komponen	Cara Uji Pewarna Tambahan Makanan SNI 01-2895-1992	Uji kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	Jika nilai Rf sampel sama dengan nilai Rf standar Rhodamin B maka fase gerak dinyatakan optimal

3.6 Prosedur Analisis

- **Preprasi Plat KLT**

- Dipotong plat KLT dengan ukuran 3 cm x 10 cm sebanyak 13 lembar
- Dikeringkan plat KLT di dalam oven dengan suhu 100°C selama 15 menit
- Dimasukkan ke dalam desikator
- Diberi tanda batas atas 0,5 cm dan batas bawah 1 cm
- Diberi tanda untuk penotolan

- **Pemekatan Rhodamine B Standart 1%**

- Dipipet larutan standart Rhodamine 1% sebanyak 10 ml
- Dimasukkan ke dalam cawan penguap dengan suhu 70°C
- Ditunggu hingga mengental

- **Pembuatan Fase Gerak SNI**

1. n-Butanol : Asam Asetat glasial : Air (2:4:2,4) 15 ml SNI-01-2895-1992
 - Dipipet 7,1 mL n-Butanol
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 3,6 mL Asam asetat glasial
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan n-Butanol
 - Dipipet 4,3 mL Air
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan n-Butanol dan Asam Asetat Glasial

- Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
- Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
- Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass

2.

n-Butanol : Asam Asetat glasial : Air (4:5:1) 15 ml SNI-01-2895-1992

- Dipipet 6 mL n-Butanol
- Dimasukkan dalam beaker glass
- Dipipet 7,5 mL Asam asetat glasial
- Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan n-Butanol
- Dipipet 1,5 mL Air
- Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan n-Butanol dan Asam Asetat Glasial
- Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
- Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
- Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass

• **Pembuatan Fase Gerak yang dikembangkan**

1. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (9:4:5) 15 ml

- Dipipet 7,5 mL Aseton
- Dimasukkan dalam beaker glass
- Dipipet 3,3 mL n-Heksana
- Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
- Dipipet 4,2 mL Amonia 25%
- Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
- Homogenkan dengan digoyang - goyangkan
- Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
- Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass

2. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5) 15 ml

- Dipipet 8 mL Aseton
- Dimasukkan dalam beaker glass
- Dipipet 3 mL n-Heksana
- Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton

- Dipipet 4 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
3. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (11:4:5) 15 ml
- Dipipet 8,3 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 3 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 3,7 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
4. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:3:5) 15 ml
- Dipipet 8,3 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 2,5 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 4,2 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
5. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5) 15 ml
- Dipipet 8 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass

- Dipipet 3 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 4 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
6. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:5:5) 15 ml
- Dipipet 7,6 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 3,7 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 3,7 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
7. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:4) 15 ml
- Dipipet 8,4 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 3,3 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 3,3 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
8. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5) 15 ml

- Dipipet 8 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 3 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 4 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
9. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:6) 15 ml
- Dipipet 7,5 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 3 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 4,5 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass

• **Pengujian Fase Gerak SNI**

1. n-Butanol : Asam Asetat glasial : Air (2:4:2,4) 15 ml SNI-01-2895-1992
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
2. n-Butanol : Asam Asetat glasial : Air (4:5:1) 15 ml SNI-01-2895-1992
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan

- Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
- Dielusi hingga tanda batas atas
- Hitung nilai Rf

• **Pengujian Fase Gerak yang dikembangkan**

1. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (9:4:5)
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
2. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5)
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
3. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (11:4:5)
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
4. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:3:5)
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
5. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5)
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan

- Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
6. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:5:5)
- Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
7. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:4)
- Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
8. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5)
- Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
9. Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:6)
- Plat KLT diambil dari desikator
 - Rhodamine B ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 2 totolan
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Hitung nilai Rf
- **Perhitungan nilai Rf**
- Tandai noda analit pada plat dengan pensil
 - Ukur dengan penggaris
 - Hitung menggunakan rumus yang telah tertera

- **Pembuatan fase gerak yang terpilih (perbandingan 10:4:6) dari pengembangan metode untuk elusi dengan pengotor (*Methanyl Yellow*)**
 - Dipipet 7,5 mL Aseton
 - Dimasukkan dalam beaker glass
 - Dipipet 3 mL n-Heksana
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton
 - Dipipet 4,5 mL Amonia 25%
 - Dimasukkan dalam beaker glass yang telah ditambahkan larutan Aseton dan n-Heksana
 - Homogenkan dengan digoyang – goyangkan
 - Potong kertas saring ukuran 17 cm x 8 cm
 - Dijenuhkan dengan kertas saring melingkar di dalam beaker glass
- **Pengujian fase gerak yang terpilih dari pengembangan metode dengan pengotor (*Methanyl Yellow*)**
 - Plat KLT diambil dari desikator
 - Disisi totolan kanan ditotolkan Rhodamin B, totolan kiri ditotolkan campuran Rhodamin B dengan *Mhetanyl Yellow*
 - Diletakkan plat KLT kedalam chamber yang telah di jenuhkan
 - Dielusi hingga tanda batas atas
 - Beri tanda pembeda antara Rhodamine B dan campuran Rhodamine B dengan *Mhetanyl Yellow*
 - Hitung nilai Rf

3.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

Data yang diperoleh berupa nilai Rf dari fase gerak yang telah dikembangkan kemudian dibandingkan dengan fase gerak yang paling banyak digunakan untuk analisis Rhodamin B.

3.7.2 Penyajian Data

Tabel 3. 2 Contoh Penyajian Data

No	Fase Gerak SNI	Nilai Rf	Nilai Kepolaran Total	Bukti gambar	Keterangan

1	n-Butanol : Asam Asetat glasial : Air (2:4:2,4)				
2	n-Butanol : Asam Asetat glasial : Air (4:5:1)				

No	Fase Gerak yang dikembangkan	Nilai Rf	Nilai Kepolaran Total	Bukti gambar	Keterangan
1	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (9:4:5)				
2	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5)				
3	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (11:4:5)				
4	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:3:5)				
5	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5)				
6	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:5:5)				
7	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:4)				
8	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:5)				
9	Aseton : n-Heksana : Ammonia 25% (10:4:6)				

No	Fase Gerak	Nilai Rf		Nilai Kepolaran Total	Bukti Gambar	Keterangan
		Mhetanyl Yellow	Rhodamine B			
1	SNI (n-Butanol : Asam Asetat glasial : Air) perbandingan 4:2:2,4					
2	Fase gerak yang dikembangkan (Aseton : n-Heksana : Ammonia 25%) perbandingan 10:4:6					

3.7.3 Analisis Data

Analisa data dalam penelitian ini akan disajikan dalam bentuk tabel yang menunjukkan nilai Rf Rhodamin B menggunakan fase gerak yang dikembangkan dan dibandingkan dengan nilai Rf Rhodamin standart menggunakan fase gerak SNI.