

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan untuk menganalisis dan menetapkan kadar Rhodamin B dalam perona pipi, serta melakukan validasi metode yang digunakan. Analisis Rhodamin B dalam perona pipi dilakukan dengan 4 tahapan yaitu dilakukan uji organoleptis, analisis kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan spektrofotometri UV-Vis, validasi metode (uji akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ), serta analisis kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **1. Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Ngudi Waluyo.

##### **2. Waktu Penelitian**

Proses penelitian dilaksanakan pada bulan Desember-Februari 2023.

#### **C. Subjek Penelitian**

##### **1. Populasi**

Populasi yaitu seluruh objek penelitian. Populasi dalam penelitian ini yaitu perona pipi yang tidak teregistrasi BPOM yang dijual di *e-commerce*.

## **2. Sampel**

Sampel yaitu sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Penentuan sampel dilakukan dengan metode *accidental sampling*. Sampel yang digunakan yaitu perona pipi yang tidak teregistrasi BPOM yang dijual di beberapa toko di *e-commerce* dan sesuai dengan kriteria.

## **3. Kriteria Sampel**

### **a. Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi dalam pemilihan sampel yaitu perona pipi yang tidak teregistrasi BPOM (tidak memiliki nomor registrasi BPOM pada kemasan dan tidak dapat ditemukan di link cek produk BPOM), warna merah muda, tidak mencantumkan komposisi, tulisan dalam kemasan menggunakan bahasa selain bahasa indonesia, harganya murah, dan termasuk produk yang banyak diminati di *e-commerce*.

### **b. Kriteria Eksklusi**

Kriteria eksklusi dalam pemilihan sampel yaitu perona pipi yang teregistrasi BPOM, dan perona pipi yang dijual selain di *e-commerce*.

## **4. Penetapan Jumlah Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebanyak 5 sampel perona pipi dengan merk yang berbeda, dipilih sesuai dengan kriteria yang ditetapkan.

## 5. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *non random sampling* yaitu *accidental sampling* berdasarkan kriteria sampel yang ditetapkan. Pada penelitian ini sampel yang digunakan yaitu perona pipi yang dijual di *e-commerce* yang sesuai dengan kriteria sampel yang ditetapkan.

### D. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Metode Pengukuran	Alat Ukur	Hasil Pengukuran
Rhodamin B	Rhodamin B merupakan pewarna sintetis berbentuk serbuk hijau atau ungu kemerahan yang digunakan sebagai pewarna kertas dan tekstil.	Analisis kualitatif dan kuantitatif dengan KLT dan spektrofotometri UV-Vis Uji	Lempeng KLT dan Spektrofotometer UV-Vis	Rf dan % Kadar
Perona Pipi	Perona pipi merupakan kosmetik yang digunakan untuk memberikan warna pada bagian pipi agar terlihat lebih cantik, segar, dan menarik, serta untuk menegaskan bentuk tulang pipi.	Organoleptis, analisis kualitatif dengan KLT, dan analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Indra manusia, lempeng KLT, dan Spektrofotometer UV-Vis	Bentuk sediaan, warna, bau, dan Rf
Akurasi	Akurasi (ketepatan) merupakan parameter yang menunjukkan kedekatan antara hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya.	Analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	% Recovery
Presisi	Presisi adalah parameter yang menunjukkan ukuran kedekatan nilai data satu dengan yang lainnya dalam suatu pengukuran pada kondisi analisis yang sama.	Analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	RSD

Variabel	Definisi	Metode Pengukuran	Alat Ukur	Hasil Pengukuran
Linearitas	Linieritas adalah parameter yang menunjukkan kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil yang sesuai dengan konsentrasi analit yang terdapat pada sampel pada kisaran konsentrasi tertentu.	Analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Koefisien Korelasi (r)
LOD	LOD (Batas deteksi) adalah parameter yang menunjukkan jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko.	Analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	ppm
LOQ	LOQ (Batas kuantitasi) adalah parameter yang menunjukkan kuantitas analit terkecil dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.	Analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	ppm

## E. Variabel Penelitian

### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu sampel perona pipi yang tidak teregistrasi BPOM yang didapat dari *e-commerce*.

### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu kandungan Rhodamin B dalam perona pipi, parameter validasi metode, dan kadar Rhodamin B dalam

sampel perona pipi yang tidak teregistrasi BPOM yang didapat dari *e-commerce*.

## **F. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu chamber, pipa kapiler, batang pengaduk, beaker glass (Iwaki), erlenmeyer, labu ukur 50 ml (Iwaki), labu ukur 10 ml (Iwaki), neraca analitik (Ohaus), pipet tetes, pipet ukur 10 ml, pipet ukur 2 ml (Iwaki), bulb pipet, corong kaca (Herma) vial, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), spatula, lampu UV 366 nm.

### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rhodamin B (Merck), 5 sampel perona pipi, asam klorida pekat (HCl) 4 N, etanol 90%, asam asetat 6%, aquadest, metanol pa, 2 plat silika gel GF 254, kertas saring, aluminium foil.

## **G. Prosedur Penelitian**

### **1. Uji Organoleptis**

Sampel perona pipi di uji organoleptis dengan melakukan pengamatan terhadap karakteristik sampel perona pipi berupa bentuk sediaan, warna, dan baunya.

### **2. Analisis Kualitatif**

Analisis kualitatif dilakukan untuk menganalisis ada atau tidaknya kandungan Rhodamin B pada sampel Perona Pipi. Analisis kualitatif dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dengan fase

diam silika gel dan fase gerak etanol, asam asetat, dan aquadest. Analisis dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu pembuatan larutan sampel, pembuatan larutan baku rhodamin B, pembuatan kontrol positif, pembuatan kontrol negatif dan analisis sampel. Analisis kualitatif dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk melihat bercak dan nilai Rf baku dan sampel, kemudian dilanjutkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis dengan melakukan pembacaan panjang gelombang maksimum dan pola spektrum pada sampel, kemudian hasilnya dibandingkan dengan panjang gelombang dan pola spektrum dari baku Rhodamin B.

**a. Pembuatan Larutan Sampel**

Sampel perona pipi ditimbang  $\pm 500$  mg masukkan dalam labu ukur 10 ml, tambahkan 4 tetes HCl 4 N, tambahkan 2 ml metanol dan dihomogenkan, selanjutnya ditambahkan metanol sampai 10 ml lalu homogenkan dan saring menggunakan kertas saring.

**b. Pembuatan Larutan Baku Rhodamin B 500 ppm**

Rhodamin B ditimbang  $\pm 5$  mg kemudian dilarutkan dengan metanol sampai 10 ml dan dihomogenkan.

**c. Pembuatan Larutan Kontrol Positif**

Perona pipi BPOM ditimbang 1 g dan ditambahkan 5 mg Rhodamin B lalu aduk hingga homogen, selanjutnya timbang 500 mg dan tambahkan 4 tetes HCl 4 N dan 2 ml metanol, larutkan dengan metanol dicukupkan sampai 10 ml, homogenkan. Kontrol positif berguna untuk

mengetahui ada tidaknya pengaruh dari kandungan bahan lain yang terdapat pada sampel perona pipi terhadap hasil positif analisis Rhodamin B, serta berguna sebagai larutan pembanding terhadap sampel yang terindikasi positif mengandung Rhodamin B (Sari *et al.*, 2022).

**d. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif**

Perona pipi BPOM ditimbang 500 mg kemudian ditambahkan 4 tetes HCl 4 N dan 2 ml metanol, larutkan dengan metanol dicukupkan sampai 10 ml, homogenkan. Kontrol negatif berguna untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh dari kandungan bahan lain yang terdapat pada sampel perona pipi terhadap hasil negatif analisis Rhodamin B, serta berguna sebagai larutan pembanding terhadap sampel yang terindikasi negatif mengandung Rhodamin B (Sari *et al.*, 2022).

**e. Analisis Sampel Dengan KLT**

Larutan baku Rhodamin B, kontrol positif, kontrol negatif, dan sampel ditotolkan pada plat KLT dengan jarak 1 cm dari bagian bawah plat menggunakan pipa kapiler, kemudian dibiarkan beberapa saat sampai mengering. Chamber dijenuhkan dengan fase gerak etanol, asam asetat dan aquadest (48:24:28). Plat KLT yang telah ditotolkan larutan sampel dimasukkan kedalam chamber yang telah dijenuhkan dan dibiarkan eluen bergerak naik sampai hampir mendekati batas atas plat, kemudian plat KLT diangkat dan dikeringkan lalu diamati bercak noda secara visual dan dibawah sinar UV 366 nm. Hasil positif

menunjukkan adanya Rhodamin B jika secara visual berwarna merah muda, dan noda berfluoresensi kuning jika dilihat dengan lampu UV 366 nm. Dihitung nilai Rf baku dan sampel, hasil dinyatakan positif apabila warna bercak antara sampel dengan baku memiliki Rf yang sama atau Rf dengan selisih  $\leq 0,2$  (Arfina, 2012).

**f. Analisis Sampel Dengan Spektrofotometri UV-Vis**

Sampel perona pipi ditimbang  $\pm 500$  mg, masukkan kedalam labu ukur kemudian tambahkan 4 tetes HCl 4 N, tambahkan 2 ml metanol, dan dihomogenkan. Metanol ditambahkan dan cukupkan sampai 10 ml, saring dan masukkan kedalam vial. Dilakukan pengenceran, larutan sampel 1 dan 2 dipipet sebanyak 1 ml lalu ditambah dengan metanol sampai 10 ml. Larutan sampel 3 dipipet sebanyak 5 ml lalu ditambahkan metanol dicukupkan sampai 10 ml. Larutan sampel 4 dipipet sebanyak 0,5 ml lalu ditambahkan metanol dicukupkan sampai 10 ml. Larutan sampel 5 dipipet sebanyak 1 ml dan ditambah dengan metanol sampai 10 ml, selanjutnya dilakukan pembacaan panjang gelombang sampel dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm.

**3. Analisis Kuantitatif**

Sampel yang menunjukkan hasil positif pada analisis kualitatif, selanjutnya dilakukan analisis kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui kadar Rhodamin B yang terdapat dalam sampel perona pipi tersebut.

**a. Pembuatan Larutan Baku Rhodamin B 1000 ppm**

Rhodamin B ditimbang 50 mg dan dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, tambahkan metanol secukupnya dan kocok hingga larut. Metanol ditambahkan hingga garis tanda kemudian dihomogenkan.

**b. Pembuatan Larutan Rhodamin B 50 ppm**

Larutan Rhodamin B 1000 ppm dipipet sebanyak 2,5 ml menggunakan pipet ukur kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml, tambahkan metanol sampai garis tanda dan dihomogenkan.

**c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Larutan Rhodamin B 50 ppm dipipet sebanyak 0,4 ml menggunakan pipet ukur, masukkan kedalam labu ukur 10 ml (konsentrasi 2 ppm), tambahkan metanol sampai garis tanda dan dihomogenkan. Serapan maksimum diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan blanko metanol. Pada spektrofotometer UV-Vis, sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-800 nm dan analit yang dapat diukur dengan spektrofotometer sinar tampak adalah analit yang berwarna (Warono & Syamsudin, 2013). Rhodamin B merupakan zat yang berwarna sehingga pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 400-800 nm.

**d. Penentuan Operating Time (Waktu Kerja)**

Larutan Rhodamin B 50 ppm dipipet sebanyak 0,4 ml menggunakan pipet ukur, masukkan kedalam labu ukur 10 ml (konsentrasi 2 ppm), tambahkan metanol sampai garis tanda dan dihomogenkan. Absorbansi

diukur pada panjang gelombang 545 nm dari menit ke 0 sampai menit ke 30.

**e. Penentuan Kurva Kalibrasi**

Larutan Rhodamin B 50 ppm dipipet sebanyak 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ppm) masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, kemudian ditambahkan metanol sampai garis tanda dan dihomogenkan. Serapannya diukur pada panjang gelombang 545 nm, maka diperoleh absorbansi dan kurva kalibrasi

**f. Analisis Sampel**

Sampel perona pipi yang hasilnya positif dari analisis kualitatif ditimbang sebanyak  $\pm 500$  mg, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan 4 tetes HCl 4 N dan 2 ml metanol, kemudian dihomogenkan. Metanol ditambahkan dan dicukupkan sampai 10 ml, saring dan masukkan kedalam vial. Dilakukan pengenceran, larutan sampel 3 dipipet sebanyak 5 ml lalu ditambahkan metanol dicukupkan sampai 10 ml. larutan sampel 4 dipipet sebanyak 0,5 ml lalu ditambahkan metanol dicukupkan sampai 10 ml. Dilakukan pembacaan pada spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm, dan pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

#### 4. Validasi Metode

Validasi metode meliputi uji akurasi, presisi, linieritas, LOD, dan LOQ.

##### a. Akurasi

Akurasi ditentukan dengan metode penambahan baku (*standard addition method*) yaitu dengan menambahkan larutan baku Rhodamin B 2,5 ppm, 3 ppm, dan 3,5 ppm sebanyak 5 ml ke sampel perona pipi yang dipreparasi seperti pada penetapan kadar. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Persyaratan hasil akurasi yaitu rata-rata % *recovery* (perolehan kembali) berada pada rentang antara 80-120 % (Rohmah *et al.*, 2021). Uji akurasi ditentukan dengan perhitungan rumus persen perolehan kembali (%*recovery*) sebagai berikut :

$$\% \text{ Recovery} = \frac{CF - CA}{C * A} \times 100\%$$

$C_F$  = Kadar sampel yang diperoleh setelah penambahan larutan baku

$C_A$  = Kadar sampel sebelum penambahan larutan baku

$C^*_A$  = Kadar larutan baku yang ditambahkan

##### b. Presisi

Larutan baku Rhodamin B 2 ppm dianalisis serapannya pada panjang gelombang 545 nm sebanyak 6 kali pengulangan. Uji presisi dihitung berdasarkan rata-rata absorbansi, nilai standar deviasi (SD), dan *Relative Standard Deviation* (RSD). Hasil yang menunjukkan RSD sebesar <2% dapat dikatakan memenuhi kriteria dan metode yang

digunakan untuk penetapan kadar rhodamin B mempunyai ketelitian yang baik (Hasanah *et al.*, 2014).

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n}$$

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

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

### c. Linearitas

Larutan Rhodamin B 50 ppm dipipet sebanyak 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ppm) masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml, lalu ditambahkan metanol sampai garis tanda, homogenkan. Diukur serapannya pada panjang gelombang 545 nm dan diperoleh absorbansi, kemudian dibuat kurva kalibrasi antara konsentrasi dengan absorbansi, sehingga didapat persamaan regresi linear dan koefisien korelasinya. Uji linearitas dilakukan untuk menentukan nilai koefisien korelasi (r). Hasil korelasi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa terdapat linieritas yang baik antara luas area dengan konsentrasi analit, hal ini menunjukkan semakin meningkatnya konsentrasi maka semakin meningkat pula luas areanya (Fauziyah *et al.*, 2021).

### d. LOD dan LOQ

Perhitungan LOD dan LOQ dilakukan setelah didapatkan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi Rhodamin B. LOD dan

LOQ dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Rahmah, 2019).

$$\text{LOD (Limit of Detection)} = \frac{3 S_{y/x}}{SI}$$

$$\text{LOQ (Limit of Quantitation)} = \frac{10 S_{y/x}}{SI}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum(y-y_i)^2}}{n-2}$$

Keterangan :

LOD = Batas deteksi

LOQ = Batas kuantitasi

$S_{y/x}$  = Simpangan baku residual

SI = Slope (b pada persamaan garis  $y = a+bx$ )

y = Intensitas yang terbaca

$y_i$  = Intensitas yang sudah dimasukkan ke persamaan

n = Frekuensi penentuan

## H. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil analisis kualitatif dengan KLT yaitu berupa  $R_f$  baku Rhodamin B dan  $R_f$  sampel. Data hasil analisis kualitatif dengan spektrofotometri UV-Vis berupa data panjang gelombang dan pola spektrum. Kadar Rhodamin B ditentukan dengan menghitung konsentrasi dari persamaan  $y = bx+a$ , kemudian dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan rumus perhitungan kadar. Hasil validasi metode yaitu akurasi berupa % *recovery*, presisi berupa koefisien variasi, linearitas berupa koefisien korelasi ( $r$ ), dan hasil LOD LOQ. Data hasil penelitian diolah dengan menggunakan *Microsoft excel* dan dapat disajikan dalam bentuk tabel maupun dalam bentuk lainnya.