

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian ini dikategorikan sebagai penelitian non eksperimental yang termasuk ke dalam jenis penelitian deskriptif karena hanya menggambarkan keadaan yang ada berupa kadar rhodamin B pada *liptint* tanpa label BPOM yang dijual di *e-commerce*. Sampel *liptint* dilakukan uji kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang selanjutnya diuji kuantitatif menggunakan metode densitometri.

#### B. Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada periode bulan Mei 2025 sampai dengan bulan Juli 2025.

#### C. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini teknik sampling yang akan digunakan adalah *purposive sampling*, yaitu suatu metode pengambilan sampel di *e-commerce* S berdasarkan kriteria tertentu, seperti :

##### 1. Kriteria Inklusi

Kriteria sampel inklusi yang digunakan adalah *liptint* tanpa label BPOM yang dijual di *e-commerce* dengan warna merah terang, produk sudah terjual lebih dari 300 pcs, bintang di atas 4,6, dan harga produk berkisar Rp2.500 – Rp35.000.

##### 2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusinya yaitu wadah *liptint* yang diterima rusak, *liptint* yang sudah kedaluwarsa, *liptint* yang berasal dari toko yang sama, dan *liptint* yang merupakan produk *pre-order*.

Metode *purposive sampling* diterapkan dengan mempertimbangkan karakteristik sampel yang telah ditentukan, sehingga diperoleh populasi sejumlah tiga puluh produk *liptint* yang dijual di *e-commerce*. Berdasarkan rumus dari  $\sqrt{N+1}$  dipilih 7 sampel *liptint* dari 30 populasi yang memenuhi kriteria sebagai sampel dengan setiap toko diwakili untuk satu sampel yang memenuhi kriteria.

#### D. Variabel Penelitian

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *liptint* yang dijual di *e-commerce*.

##### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai  $R_f$  dan kadar rhodamin B dalam sampel *liptint*.

##### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bentuk warna, dan pelarut fase gerak yaitu *n*-butanol : etil asetat : amonia dengan perbandingan 10:4:5.

#### E. Definisi Operasional

Penelitian ini menggunakan sampel *liptint* tanpa label BPOM yang beredar di *e-commerce*. Proses ekstraksi dilakukan pada sampel yang diperoleh, dan kemudian dilarutkan dalam metanol. Uji kualitatif dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase gerak *n*-butanol : etil asetat : amonia dengan perbandingan 10:4:5. Sedangkan, uji kuantitatif menggunakan metode densitometri dengan *scanning* noda pada plat KLT untuk melihat nilai luas area (AUC). Kadar rhodamin B dinyatakan dalam satuan % b/b.

#### F. Alat dan Bahan

##### 1. Alat

Alat yang digunakan adalah *scanner* densitometer (*Camag TLC Scanner*), timbangan analitik (*Ohaus*), lampu UV, *waterbath* (*Memmert*), set alat gelas (*Iwaki*), bejana kromatografi (*Camag*), mikropipet (*Ohaus*), dan oven (*Memmert*).

## 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi pembanding rhodamin B (BPL), *liptint* tanpa label BPOM yang diperoleh di *e-commerce*, *n*-butanol *p.a* (*Merck*), amonia *p.a* (*merck*), etil asetat *p.a* (*merck*), akuades, asam klorida 4 M (teknis), lempeng KLT silika Gel F254, natrium sulfat anhidrat (*Merck*), dan pipa kapiler *for densitometer* (*Camag*).

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Analisis Organoleptis

Sediaan *liptint* dideskripsikan masing-masing meliputi bentuk, warna, dan aroma (Puspitasari *et al.*, 2023).

### 2. Pembuatan Larutan Sampel

*Liptint* ditimbang 2 gr menggunakan timbangan analitik, dimasukkan ke dalam cawan porselen 250 mL, kemudian ditambahkan 30 mL metanol *p.a* dan 16 tetes asam klorida 4 M, selanjutnya diaduk hingga homogen. Setelah itu, larutan dipanaskan di atas penangas air dan disaring menggunakan kertas saring whatman yang telah diberi natrium sulfat anhidrat. Penyaringan dilakukan berulang hingga diperoleh filtrat yang jernih. Selanjutnya, filtrat dipindahkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan ditambahkan metanol *p.a* hingga mencapai tanda batas, kemudian dihomogenkan. Setelah itu, sebanyak 2,0 mL filtrat kemudian dipipet, dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, lalu dicukupkan dengan metanol *p.a* hingga garis tanda batas (Maulinda *et al.*, 2024).

### 3. Pembuatan Larutan Standar Rhodamin B

Rhodamin B (BPL) ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg, dilarutkan terlebih dahulu sebagian, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL. Setelah itu, ditambahkan dengan metanol *p.a*, dan larutan dihomogenkan dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit hingga larut. Setelah larut, volume larutan dicukupkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan rhodamin B dengan konsentrasi 1000 ppm kemudian ditentukan panjang gelombangnya (Hiola *et al.*, 2021).

### 4. Optimasi Fase Gerak

Larutan standar rhodamin B dan larutan sampel *liptint* yang telah

dipreparasi diuji menggunakan beberapa kombinasi fase gerak, yaitu etil asetat : metanol : amonia (15:3:3) dan *n*-butanol : etil asetat : amonia (10:4:5). Sebanyak 10  $\mu$ L larutan standar dan sampel ditotolkan pada plat KLT silika gel F254, kemudian dielusi dalam *chamber* yang telah dijenuhkan dengan fase gerak selama  $\pm$  40 menit. Setelah proses elusi selesai, plat diamati secara visual dan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm serta 366 nm untuk melihat posisi bercak. Fase gerak dikatakan optimal apabila dapat memisahkan bercak secara jelas, tidak saling menumpuk, dan menghasilkan nilai  $R_f$  yang berbeda secara signifikan antara senyawa target dan pengotornya (Suharyani *et al.*, 2021).

#### 5. Analisis Kualitatif Sampel *Liptint*

##### a. Penjenuhan bejana kromatografi

Larutan *n*-butanol : etil asetat : amonia dengan perbandingan 10:4:5 yang dibuat dalam 20 mL, dicampurkan ke dalam bejana, kemudian dimasukkan kertas saring ke dalamnya. Bejana ditutup rapat, dan fase gerak dibiarkan menguap untuk membasahi seluruh permukaan kertas saring. Bejana kromatografi dapat dikatakan jenuh apabila fase gerak telah sepenuhnya membasahi permukaan kertas saring (Ananda *et al.*, 2019).

##### b. Pengaktifan fase diam

Plat KLT silika F254 dengan ukuran 10 x 10 cm, ditandai batas atas dan dibawah pada lempeng KLT sejauh 1 cm serta batas titik penotolan 0,8 cm, kemudian plat KLT diaktifkan terlebih dahulu dengan cara di panaskan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit (Maulinda *et al.*, 2024).

##### c. Pembuatan seri larutan baku rhodamin B

Ditimbang 50,0 mg rhodamin B dan dimasukkan dalam labu ukur 50,0 mL, lalu ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas, dan dihomogenkan sehingga akan diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi larutan rhodamin B, yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm dengan cara memindahkan 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; dan 0,25 mL dari larutan standar rhodamin B konsentrasi 1000 ppm ke dalam labu ukur 25,0 mL, kemudian diencerkan dengan metanol *p.a* sampai tanda batas (Maulinda *et al.*, 2024).

d. Identifikasi sampel pada plat KLT

Ditotolkan larutan pembanding rhodamin B dengan konsentrasi 1 dan 5 ppm serta 7 sampel *liptint* sebanyak 10  $\mu$ L pada plat KLT menggunakan pipa kapiler *for* KLT-Densitometri secara berurutan. Selanjutnya plat KLT diekspansi dalam bejana yang telah jenuh dengan fase gerak *n*-butanol : etil asetat : amonia dengan perbandingan 10:4:5 (Ananda *et al.*, 2019). Plat KLT didiamkan hingga totolan kering pada suhu ruang atau lemari asam. Setelah kering, plat KLT dimasukkan ke dalam bejana kromatografi berisikan eluen yang telah dijenuhkan, ditutup rapat dan ditunggu hingga plat KLT terelusi sempurna sampai dengan tanda yang ditentukan (Maulinda *et al.*, 2024). Jika dilihat secara visual menunjukkan noda berwarna merah jambu dan tampak berwarna orange dengan fluoresensi kuning terang di bawah sinar UV 366 nm serta tampak kuning pucat di bawah sinar UV 254 nm, maka hal tersebut menunjukkan adanya keberadaan rhodamin B. Setelah itu, dihitung nilai Rf pada masing-masing totolan. Rf sampel dibandingkan dengan nilai Rf baku pembanding. Sampel dikatakan positif rhodamin jika memiliki selisih nilai Rf  $< 0,05$  (Asmawati *et al.*, 2019).

6. Analisis Kuantitatif Sampel *Liptint*

a. Penjenuhan bejana kromatografi

Larutan *n*-butanol : etil asetat : amonia dengan perbandingan 10:4:5 yang dibuat dalam 20 mL, sehingga volume yang dibuat dengan perbandingan 10,5:4,2:5,3 mL dicampurkan ke dalam bejana, kemudian dimasukkan kertas saring ke dalamnya. Bejana ditutup rapat, dan fase gerak dibiarkan menguap untuk membasahi seluruh permukaan kertas saring. Bejana kromatografi dapat dikatakan jenuh apabila fase gerak telah sepenuhnya membasahi permukaan kertas saring (Ananda *et al.*, 2019).

b. Pengaktifan fase diam

Plat KLT silika F254 dengan ukuran 10 x 10 cm, ditandai batas atas dan di bawah pada lempeng KLT sejauh 1 cm serta batas titik penotolan 1,6 cm, kemudian plat KLT diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit (Maulinda *et al.*, 2024).

c. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan rhodamin B 100 ppm dipipet sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Selanjutnya, ditambahkan etanol *p.a* sampai garis tanda dan dihomogenkan. Setelah itu, diukur serapan maksimumnya pada panjang gelombang 400 – 800 nm dengan menggunakan etanol *p.a* sebagai blangko (Asmawati et al., 2019a).

d. Identifikasi sampel pada plat KLT

Ditotolkan seri konsentrasi rhodamin B dan sampel *liptint* sebanyak 5  $\mu\text{L}$  pada plat KLT menggunakan pipa kapiler *for* KLT-Densitometri secara berurutan. Selanjutnya plat KLT diekspansi dalam bejana yang telah jenuh dengan fase gerak *n*-butanol : etil asetat : amonia dengan perbandingan 10:4:5 (Ananda et al., 2019). Plat KLT didiamkan hingga totolan kering pada suhu ruang atau lemari asam. Setelah kering, plat KLT dimasukkan ke dalam bejana kromatografi berisikan eluen yang telah dijenuhkan, ditutup rapat dan ditunggu hingga plat KLT terelusi sempurna sampai dengan tanda yang ditentukan (Maulinda et al., 2024). Jika dilihat secara visual menunjukkan noda berwarna merah jambu dan tampak berwarna orange dengan fluoresensi kuning terang di bawah sinar UV 366 nm serta tampak kuning pucat di bawah sinar UV 254 nm, maka hal tersebut menunjukkan adanya keberadaan rhodamin B (Asmawati et al., 2019).

e. Penetapan kadar rhodamin B pada sampel *liptint* dengan densitometri

Sampel *liptint* yang positif rhodamin B, selanjutnya dilakukan pengujian dengan densitometer untuk mengetahui kadar rhodamin B yang terkandung dalam *liptint*. Hasil dari pengujian ini menunjukkan konsentrasi rhodamin B yang terdapat dalam *liptint* berdasarkan nilai *Area Under Curve* (AUC) yang diukur pada panjang gelombang maksimal rhodamin B (Asmawati et al., 2019). Nilai AUC dapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear dari persamaan kurva baku  $y = bx + a$ , di mana nilai AUC berfungsi sebagai  $y$ . Dari persamaan tersebut, diperoleh nilai  $x$ , yang selanjutnya dimasukkan ke dalam rumus persentase kadar untuk mengetahui nilai kadar sesungguhnya.

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

### 1. Analisis Data

#### a. Uji kualitatif Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil bercak noda pada plat KLT dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm yang sudah didapatkan dihitung nilai Rf nya. Nilai Rf dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Maulinda *et al.*, 2024) :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh}}{\text{Komponen jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Nilai Rf dari setiap sampel yang didapat dibandingkan dengan Rf standar rhodamin B (Maulinda *et al.*, 2024).

#### b. Uji kuantitatif densitometri

Hasil bercak noda pada plat KLT di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm yang sudah berfluoresensi difoto menggunakan kamera. Hasil gambar dianalisis menggunakan densitometer untuk dilihat nilai luas area (AUC) dari setiap bercak noda yang terdapat di plat KLT. Nilai luas area (AUC) tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan kurva kalibrasi linier yaitu,  $y = bx + a$  yang diperoleh berdasarkan hubungan antara konsentrasi (x) dengan respon AUC (y) (Asmawati *et al.*, 2019). Selanjutnya, perhitungan kadar rhodamin B dihitung kadarnya menggunakan rumus sebagai berikut (Maulinda *et al.*, 2024) :

$$\text{Kadar (\% b/b)} = \frac{K \times V \times F_p}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

K = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel (mg/mL)

V = Volume larutan sampel (mL)

F<sub>p</sub> = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (mg)

### 2. Nilai Rata-rata

Nilai rata-rata adalah nilai yang mewakili kumpulan data. Mean atau rata-

rata didapatkan dengan menjumlahkan keseluruhan data dibagi dengan banyaknya data (Fitria *et al.*, 2018).

$$\bar{x} = \frac{\text{Jumlah seluruh data}}{\text{Banyak Data}}$$

Keterangan :

$\bar{x}$  = Nilai rata-rata

### 3. Standar Deviasi (SD)

Simpangan baku atau standar deviasi adalah nilai yang digunakan untuk menentukan seberapa untuk menentukan seberapa dekat nilai data dengan nilai rata-rata (Yusniyanti & Kurniati, 2017).

### 4. Coefficient Variation (CV)

$$CV = \frac{SD}{\text{Rata - rata}} \times 100\%$$

Koefisien varian atau *variation coefficient* adalah perbandingan antara deviasi standar dengan nilai rata-rata hitung (Yusniyanti & Kurniati, 2017)

Keterangan :

CV = Koefisien Variasi

SD = Simpangan baku (nilai rata-rata)

### 5. Limit of Error (LE)

LE (*Limit of Error*) atau CI (*Confidence Interval*) adalah perkiraan rentang nilai yang mencakup nilai populasi sebenarnya (Hazra, 2017).

$$LE = t - \text{tabel} \times \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Keterangan :

LE = *Limit of Error* atau batas kesalahan.

t tabel = Nilai t kritis yang diambil dari tabel distribusi t - *student*.

SD = Simpangan baku

$\sqrt{N}$  = Akar kuadrat dari jumlah sampel (n).