

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### 1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif kuantitatif, dimana sampel lipstik yang diduga mengandung Rhodamin B akan diobservasi dan dilanjutkan dengan melakukan analisis sampel di Laboratorium. Penelitian deskriptif yaitu penelitian yang mengarah pada pengungkapan suatu masalah atau keadaan berdasarkan fakta yang ada dengan tujuan mengumpulkan data. Jenis perlakuan dalam penelitian yaitu kuantitatif, dimana sampel akan dianalisis menggunakan metode pencitraan digital dan program ImageJ. Kemudian dihitung kadar Rhodamin B yang terkandung pada sampel dari persamaan kurva kalibrasi RGB. Taraf perlakuan dalam penelitian yaitu terdapat delapan perlakuan pada pembuatan deret intensitas warna kompleks Zn-tiosianat-Rhodamin B dan masing-masing sampel diberikan tiga kali replikasi dengan penambahan reagen pada sampel. Jumlah unit percobaan dalam penelitian ini yaitu 15 dengan jumlah sampel yang digunakan sebanyak lima.

#### 1.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang, Jalan Besar Ijen No. 77, Oro Oro Dowo, Kec. Klojen, Kota Malang, Jawa Timur pada bulan Januari hingga Februari 2022.

#### 1.3 Alat dan Bahan

##### 1.3.1 Alat

Beberapa alat yang digunakan pada penelitian yaitu gelas beaker 100 ml (pyrex), gelas beaker 250 ml pyrex), gelas beaker 50 ml (pyrex), labu takar 10 ml (pyrex), kaca arloji, batang pengaduk, spatula, timbangan analitik, pipet tetes, pipet volume 10 ml (pyrex), pipet ukur 10 ml pyrex), bola hisap, tabung reaksi, rak tabung reaksi, chamber (bejana kromatografi lapis tipis), kamera dan computer atau laptop dengan aplikasi Image J didalamnya.

### 1.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu baku Rhodamin B (teknis),  $ZnCl_2$  merck, KSCN merck, akuades, asam asetat 98% analisis merck, lipstik berwarna merah, etil asetat merck, n-heksan (pa), ammonia 25% samartlab, methanol (pa), asam fosfat (pa), dimetil formamida (pa), kertas saring whatman, lempeng KLT dan kardus. Untuk bahan-bahan kimia diperoleh dari Tolo alat kesehatan Nurra Gemilang, Krida dan Phy Edumedia. Penyimpanannya dalam suhu ruang, kering dan terhindar dari sinar matahari secara langsung agar tidak terjadi kerusakan pada bahan kimia tersebut. Khusus larutan  $ZnCl_2$ , KSCN dan asam asetat disimpan dalam botol gelap agar tidak terjadi perubahan struktur kimia dan kandungan pada larutan tersebut.

Sampel diperoleh dari tiga Pasar di wilayah Grati, Kabupaten Pasuruan yaitu Pasar Dawe, Pasar Grati dan Pasar Trewung dengan mengambil lipstik yang berwarna merah dan difokuskan pada lipstik yang tidak bermerk serta belum memiliki izin BPOM. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil 2 sampel dari Pasar Dawe, 2 sampel dari Pasar Grati dan 1 sampel dari Pasar Trewung. Sampel disimpan dalam suhu ruang dan kering serta dihindarkan dari sinar matahari untuk menghindari kerusakan pada sampel. Cara mempersiapkan sampel untuk unit percobaan yaitu dengan menghaluskan 2 gram sampel, kemudian ditambahkan 2 ml asam setat encer dan 30 ml akuades dalam gelas beaker 100 ml.

### 1.4 Variabel Penelitian

Variable penelitian terdiri dari variable bebas (independent variable) dan variable terikat (dependent variable). Adapun variable bebas dalam penelitian ini yaitu beberapa jenis lipstik berwarna merah dan variable terikat yaitu kandungan Rhodamin B dalam sampel.

### 1.5 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variable dapat disajikan dalam tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

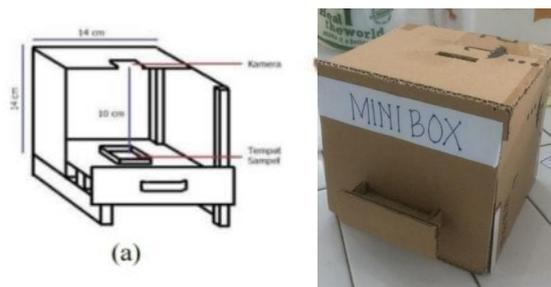
No.	Variable	Definisi	Metode	Instrumen	Skala
1.	Rhodamine B	<p>Rhodamine B adalah zat pewarna yang berupa serbuk kristal warna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau dan mudah larut dalam larutan warna merah terang berfluoresan.</p> <p>Rhodamine B termasuk zat warna dari golongan pewarna kationik yang digunakan sebagai bahan pewarna tekstil, cat, kertas atau pakaian.</p> <p>Penggunaannya dalam bahan pangan dan kosmetik dilarang karena berbahaya bagi kesehatan dan bersifat karsinogenik.</p>	<p>Analisis secara kuantitatif menggunakan metode kolorimetri.</p> <p>Analisis secara kuantitatif menggunakan metode pencitraan digital.</p>	Kamera handphone	Rasio
2.	Metode kolorimetri	<p>Metode kolorimetri adalah metode perbandingan berdasarkan perbedaan warna. Metode ini banyak digunakan karena mudah, cepat, sederhana dan tidak</p>	<p>Reaksi pembentukan warna</p>	1 jenis pelarut	Ordinal

		membutuhkan keahlian khusus.			
3.	Pencitraan digital	Metode pencitraan digital merupakan metode pembaruan dari analisis kolorimetri menggunakan alat yang sederhana dan relative mudah penggunaannya, pengukuran pada metode tersebut dianalisis dalam software seperti image J, adobe photoshop dan scanner.	Hasil pengambilan gambar dianalisis menggunakan software IamgeJ dan dihasilkan data intensitas cahaya komponen warna RGB. Kemudian dari data tersebut dibuat kurva baku dan kurva yang memiliki nilai r mendekati 1 digunakan sebagai acuan perhitungan untuk menghitung kadar Rhodamin B pada sampel	Kamera hanphone dan laptop yang terdapat program ImageJ didalamnya.	Rasio

## 1.6 Metode Penelitian

### 1.6.1 Pembuatan minibox

Minibox dibuat dari kardus dengan beberapa bagian yaitu bentuk kubus ukuran  $14 \times 14 \times 14$  cm. Setiap sisinya ditutup sehingga cahaya dari luar tidak mengganggu pada proses pengambilan gambar dan sejauh 10 cm dari sisi kardus dibuat tempat kamera. Minibox dibuat dengan sketsa pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Minibox

#### 1.6.2 Pembuatan reagen $\text{Zn}(\text{CNS})_2$

Reagen dibuat dengan menambahkan 1 ml larutan  $\text{ZnCl}_2$  2 M dan 2 ml larutan KCNS 2 M dalam labu ukur 10 ml.

#### 1.6.3 Pembuatan deret intensitas warna kompleks Zn-tiosianat-Rhodamin B dalam bentuk larutan

Dibuat larutan standar Rhodamin B konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 dan 14 ppm dengan cara menambahkan 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 1,0 dan 1,4 ml larutan Rhodamin B 100 ppm ke dalam 8 labu ukur 10 ml yang telah diisi dengan larutan  $\text{Zn}(\text{CNS})_2$ . Selanjutnya tiap labu ukur ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas. Kemudian tiap larutan diambil gambarnya menggunakan kamera. Hasil pengambilan gambar berupa gambar digital yang selanjutnya dianalisa dengan aplikasi ImageJ.

#### 1.6.4 Preparasi sampel

Sampel dipreparasi dengan cara menghancurkan 2 gram sampel lipstik dan dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 ml. Selanjutnya ditambahkan 2 ml asam asetat encer dan 30 ml akuades, kemudian larutan tersebut dipanaskan pada suhu sedang sambil diaduk hingga larut sempurna. Larutan tersebut dipindahkan dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan larutan  $\text{Zn}(\text{CNS})_2$ . Adanya Rhodamin B ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan dari merah menjadi ungu. Selanjutnya larutan yang dihasilkan tersebut dimasukkan ke dalam minibox kemudian diambil gambarnya dengan menyalakan flash (kilat) pada kamera handphone. Selanjutnya hasil foto tersebut dianalisis menggunakan program ImageJ dan data intensitas cahaya komponen warna RGB untuk setiap larutan.

#### 1.6.5 Uji lanjutan menggunakan metode kromatografi lapis tipis

Sampel yang diduga positif dilakukan pengujian lanjutan menggunakan kromatografi lapis tipis sesuai dengan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia tentang metode analisis kosmetika.

##### 1.6.5.1 Pembuatan pelarut campur

Pelarut campur terbuat dari campuran N,N-dimetilformamida dan asam ortofosfat dengan perbandingan 95 : 5 yang dibuat baru.

##### 1.6.5.2 Pembuatan larutan pengembang (fase gerak)

Larutan pengembang yang digunakan terbuat dari campuran etil asetat - methanol – [ammonia 25% - akuades (3:7)] dengan perbandingan 15:3:3 yang dibuat baru.

##### 1.6.5.3 Penyiapan larutan baku

Ditimbang saksama sejumlah Rhodamin B dan diencerkan dengan methanol atau DMF atau pelarut campur hingga kadar 0,2 mg/ml.

##### 1.6.5.4 Penyiapan larutan uji

Ditimbang saksama lebih kurang 0,1 – 0,3 gram sampel dan dilarutkan dalam 2 ml pelarut campur. Dilakukan ekstraksi lemak 2 kali, setiap kali dengan 5 ml n-heksan dan dikumpulkan ekstrak n-heksan. Jika ekstrak berwarna, ekstraksi kembali dengan 2 ml pelarut campur dan dibuang lapisan n-heksan. Disaring lapisan pelarut campur melalui penyaring. Digunakan diltrat sebagai larutan uji.

##### 1.6.5.5 Prosedur KLT

- Dijenuhkan bejana KLT dengan mencelupkan kertas saring dalam larutan pengembang hingga larutan mencapai batas eluasi.

- Disiapkan lempeng KLT dengan membuat batas penotolan dan batas eluasi lebih kurang 15 cm, kecuali untuk larutan pengembang system A lebih kurang 11 cm.
- Ditotolkan secara terpisah masing masing 1  $\mu\text{L}$  sampai 5  $\mu\text{L}$  larutan baku dan sejumlah volume sama larutan uji pada batas penotolan.
- Dikembangkan lempeng KLT dalam masing-masing bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang sampai batas eluasi pada suhu ruang.
- Diangkat lempeng KLT dan dikeringkan pada suhu ruang.

### 1.7 Metode analisis

Metode analisis dalam penelitian ini menggunakan metode pencitraan digital dan hasilnya dianalisis dalam software image j. Metode pencitraan digital termasuk metode kolorimetri tidak langsung karena dalam analisisnya memerlukan penambahan reagen dan software image j untuk mendapatkan hasilnya. Sebelum dilakukan penerapan metode pencitraan digital pada sampel, perlu dilakukan validasi metode terlebih dahulu. Sehingga dapat diketahui metode tersebut dapat diterapkan pada sampel atau tidak.

Sampel yang diduga positif mengandung Rhodamin B akan berubah menjadi warna ungu. Selanjutnya kadar Rhodamin B yang terdapat pada sampel tersebut dihitung menggunakan persamaan linieritas yang memiliki nilai r mendekati 1. Selanjutnya sampel tersebut diuji lebih lanjut menggunakan metode standar yaitu kromatografi lapis tipis agar data yang diperoleh lebih valid.

### 1.8 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Cara mengukur konsentrasi Rhodamin B yaitu dengan menggunakan rumus berikut.

$$\text{ppm} = \frac{\text{massa zat terlarut (mg)}}{\text{volume larutan (L)}}$$

Dari rumus tersebut, dapat diketahui volume larutan yang akan diambil pada konsentrasi tertentu untuk membuat larutan baku Rhodamin B. Setelah diperoleh gambar digital dari pengambilan gambar larutan blanko dan larutan sampel yang

diduga mengandung Rhodamin B, selanjutnya gambar tersebut dianalisa dalam program ImageJ sehingga diperoleh nilai RGB dan dibuat persamaan kurva kalibrasinya. Berdasarkan kurva tersebut, dipilih persamaan yang memiliki nilai r mendekati 1 dan dari persamaan tersebut didapatkan kadar Rhodamin B dalam satuan ppm. Selanjutnya dilakukan validasi metode dengan menghitung linieritas, nilai akurasi, nilai presisi, batas LOD dan LOQ.

#### 1.8.1 Penentuan linieritas

Hasil analisis larutan deret intensitas dalam program image j selanjutnya dihitung absorbansinya dan dibuat kurva linieritasnya. Kurva yang nilai r nya mendekati 1 dan linier dapat digunakan untuk perhitungan kadar.

#### 1.8.2 Penentuan nilai akurasi

Akurasi adalah kedekatan atau kesesuaian respon antara rata-rata respon pada analit terhadap nilai yang sebenarnya. Akurasi juga disebut dengan persen perolehan kembali (% recovery), dimana penambahan sejumlah sampel pada analit yang telah diketahui kadarnya dilakukan untuk menghitung % recovery dengan persamaan berikut (Harmita, 2004).

$$\% \text{ recovery} : \frac{\text{konsentrasi hasil percobaan}}{\text{konsentrasi teoritis}} \times 100\%$$

Adapun setelah dihitung nilai % recovery, selanjutnya nilai tersebut dicocokkan dengan ketentuan % recovery yang terdapat pada tabel 3.1.

Tabel 3.2 Batasan Awal % Recovery

Konsentrasi analit (%)	Unit	Akurasi (recovery)	Presisi (RSD %)
100	100%	98- 102	1.3
≥ 10	10%	98- 102	2.7
≥ 1	1%	97-103	2.8
≥ 0,1	0,1%	95-105	3.7
0,01	100 ppm	90-107	5.3
0,001	10 ppm	80-110	7.3

0,0001	1 ppm	80-110	11
0,00001	100 ppb	80-110	15
0,000001	10 ppb	60-115	21
0,0000001	1 ppb	40-120	30

### 1.8.3 Penentuan nilai presisi

Ukuran kedekatan hasil analisis diperoleh dari serangkaian pengukuran ulangan dari ukuran yang sama disebut presisi. Kesalahan acak yang terjadi dalam sebuah metode dapat dicerminkan dari nilai presisi. Presisi diukur sebagai koefisien variasi atau deviasi standar relative dari hasil analisis yang diperoleh dari independent disiapkan standar control kualitas. Penentuan presisi terdiri dari tiga kategori yaitu keterulangan (repeatability), presisi antara (intermediate precission) dan ketertiruan (reproducibility). Nilai presisi atau nilai keterulangan dapat dihitung dengan persamaan berikut (Harmita, 2004) :

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

Ket : X = konsentrasi masing-masing pengukuran

$\bar{X}$  = rata-rata dari konsentrasi

n = frekuensi penetapan.

$$\%RSD = \frac{SD}{Pr} \times 100\%$$

Ket : RSD = relatif standar deviasi

SD = standar deviasi

Pr = rata-rata dari pengukuran

#### 1.8.4 Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil pada analit dalam sampel yang memberikan respon secara signifikan dibandingkan dengan blanko, sedangkan batas kuantitas adalah jumlah terkecil dari analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria akurasi dan presisi. Batas deteksi dapat diukur menggunakan respon blanko dan respon simpangan baku pada blanko. Berikut ini persamaan untuk menghitung batas deteksi dan batas kuantitas (Harmita, 2004) :

$$Q = \frac{K \times S_b}{S_1}$$

Keterangan :

Q = batas deteksi (LOD) atau LOQ (batas kuantitas)

K = nilainya 3 untuk LOD atau 10 untuk LOQ

S<sub>1</sub> = slope

Simpangan baku respon (S<sub>b</sub>) dapat dihitung dengan persamaan berikut :

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

Dimana  $y_i = a + bx$  dan n adalah jumlah data.

#### 1.8.5 Penentuan nilai R<sub>f</sub>

Nilai R<sub>f</sub> pada kromatografi lapis tipis dapat ditentukan dengan persamaan berikut ini.

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{jarak yang ditempuh fase bergerak}}$$