

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan dan jenis penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental, yaitu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui akibat dari perlakuan yang diberikan terhadap suatu hal yang diteliti. Dengan cara mengidentifikasi zat pewarna Rhodamin B pada sampel *lip tint* yang telah ditetapkan kriteria inklusinya yaitu berwarna merah dan tidak memiliki izin edar BPOM. Variabel bebas penelitian ini adalah *lip tint* dan variabel terikat penelitian ini adalah kandungan Rhodamin B dalam *lip tint*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 sampai dengan bulan Juli 2024. Waktu pengambilan data dilakukan pada bulan Januari-Februari 2024. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Muhammadiyah Gresik.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bejana/chamber (*DHG*), kertas perkamen, sendok penyu, timbangan analitik (*Centaurs scale*), labu ukur 100 ml, plat KLT silica gel 60 F254 ukuran 10x5 cm (*Merck*), kertas saring (*Whatman*), pipet tetes, gelas ukur 50 ml (*Herma*), corong gelas 50 ml, beaker glass 20 ml (*Herma*), oven, pipa kapiler, pendeteksi sinar UV 254 nm, batang pengaduk, tabung reaksi beserta rak tabung reaksi (*Herma*), benang wol, cawan porselen, waterbath (*HH-6*), Rhodamin B KIT (*Testkit.id*)

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan pada proses identifikasi Rhodamin B pada *lip tint* adalah Etil asetat grade pro analis, amonia grade pro analis, etanol 70% grade pro analis, Rhodamin B, 3 sampel liptint, HCl grade pro analis, metanol grade pro analis, aquadest, kloroform grade pro analis, amonia 2% grade pro analis, asam asetat 10% grade pro analis.

3.3 Cara penelitian

3.3.1 Prosedur kerja

A. Uji pewarnaan

Terdapat 3 sampel *lip tint* yang digunakan dengan pemberian kode A, B, dan C. Uji pewarnaan ini dilakukan dengan mendidihkan benang wol dalam aquadest lalu dikeringkan, dicuci dengan kloroform, dibilas dengan aquadest, dan dikeringkan lagi. 10 g sampel dipanaskan dalam 10 ml larutan ammonia 2% (dalam etanol 70%) selama 30 menit, lalu disaring. Filtrat diuapkan, residu dilarutkan dalam air yang mengandung asam. Benang wol dididihkan dalam larutan asam (10 mL air dicampur dengan 5 ml asam asetat 10%). selama 10 menit. Benang wol diangkat dan zat warna menempel pada benang wol, dicuci benang wol dengan air, jika warnanya tidak hilang maka positif mengandung Rhodamin B. (Laksmi *et al.*, 2018)

B. Uji Rhodamin-B kit

Terdapat 3 sampel *lip tint* yang digunakan dengan pemberian kode A, B, dan C. Kit Rhodamin B yang digunakan berisi 2 reagen yaitu reagen 1, reagen 2, dan larutan baku Rhodamin B, Cara identifikasinya yaitu dengan dimasukkan 1 g sampel yang akan diuji dalam 1 ml aquadest, lalu cacah dan hancurkan dengan pengaduk sampai larut seluruhnya. Diambil sampel sebanyak 1-2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditetesi reagen 1 dan reagen 2 yang sudah tercantum pada box, ditetesi reagen 1 sebanyak 5 tetes dan kocok kencang ad homogen, setelah itu ditetesi dengan reagen 2 sebanyak 5 tetes dan kocok kencang ad homogen, jika terjadi timbul warna ungu maka sampel mengandung Rhodamin B (Asmi *et al.*, 2023).

C. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Terdapat 3 sampel *lip tint* yang digunakan dengan pemberian kode A, B, dan C.

a. Pembuatan larutan fase gerak

Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : etanol 70% : amonia (12,5 : 5 : 2,5) (Elfasyari *et al.*, 2020).

b. Pembuatan larutan baku Rhodamin B

Ditimbang 10 mg pewarna rhodamin B baku dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan etanol 70% sampai dengan tanda batas. Larutan dikocok secara homogen (Elfasyari *et al.*, 2020).

c. Ekstraksi dan Pembuatan larutan sampel uji

Ditimbang sampel *lip tint* sebanyak 2g, Kemudian ditambahkan 20 tetes HCl dan 10 ml metanol, diaduk sampai sampel tercampur lalu hasil larutan disaring dengan kertas saring dan ditambahkan metanol sampai 50 ml (Pujiati *et al.*, 2023)

d. Uji Rhodamin B

Dijenuhkan fase gerak etil asetat : etanol 70% : amonia (12,5 : 5 : 2,5) dalam chamber. Plat KLT Silica Gel 60 F254 berukuran 10x5 cm dipanaskan di oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Larutan baku dan larutan sampel ditotolkan dengan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari bawah bagian plat dan jarak antar noda 1 cm. lalu plat KLT dibiarkan hingga mengering, lalu dimasukkan ke dalam *chamber* yang fase geraknya sudah dijenuhkan hingga terelusi sempurna. Kemudian dikeluarkan plat dari bejana dan dikeringkan pada suhu ruang. Kemudian diamati secara visual dimana noda akan berwarna merah muda, jika dilihat dibawah sinar UV 254 nm akan berfluorosensi kuning (Fauziah *et al.*, 2020)

3.4 Analisis hasil

Pada penelitian ini diperoleh beberapa data uji kualitatif Rhodamin B meliputi uji pewarnaan, uji Rhodamin B KIT, dan Uji Kromatografi Lapis Tipis. Hasil data dari ke tiga pengujian tersebut disajikan dalam bentuk tabel dan dibandingkan dengan masing masing hasil baku pembanding tiap uji, kemudian di

jelaskan kesimpulan yang menggambarkan data yang telah disajikan dalam tabel agar lebih mudah dipahami

3.4.1 Uji benang wol / Uji pewarnaan

Uji ini ditandai dengan pelunturan warna pada benang wol. Jika setelah dibilas dengan air, warna merah pada benang wol masih menempel maka dapat dikatakan sampel tersebut mengandung Rhodamin B

Tabel 3.1 Tabel Uji benang wol

No	Kode sampel	Warna benang wol				Hasil (+/-)
		B	P1	P2	P3	
1	A					
2	B					
3	C					

Keterangan :

B : Baku Pembanding

P1 : Pengulangan 1

P2 : Pengulangan 2

P3 : Pengulangan 3

3.4.2 Uji Rhodamin B Kit

Analisis uji ini diamati berdasarkan perubahan warna setelah ditetesi kedua reagen Rhodamin B kit. Jika timbul warna ungu maka sampel mengandung Rhodamin B (Asmi *et al.*, 2023).

Tabel 3.2 Tabel Uji Rhodamin B kit

No	Kode sampel	Perubahan Warna (R1 + R2)				Hasil (+/-)
		B	P1	P2	P3	
1	A					
2	B					
3	C					

Keterangan :

R1 : Reagen 1

R2 : Reagen 2

B : Baku Pembanding

P1 : Pengulangan 1

P2 : Pengulangan 2

P3 : Pengulangan 3

3.4.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Setelah dilakukan pengamatan noda bercak pada plat KLT, selanjutnya menghitung nilai Rf sampel (A, B, dan C) dan dibandingkan dengan nilai Rf pembanding Rhodamin B. dengan menggunakan rumus Rf berikut :

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh zat yang diteliti}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Sampel dikatakan positif mengandung rhodamin B jika selisih antara nilai Rf pembanding dengan nilai Rf sampel yaitu sama atau saling mendekati dengan selisih nilai Rf < 0,2 (Sa'ad *et al.*, 2019)

Tabel 3.3 Tabel Uji Kromatografi Lapis Tipis

No	Identitas sampel	Warna noda		Nilai Rf	Keterangan (+/-)
		Visual	Sinar UV		
1	Pembanding Rhodamin B				
2	Sampel A				
3	Sampel B				
4	Sampel C				

