

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November sampai dengan Juni 2022. Data penelitian ini diambil pada bulan Juni 2022 dan bertempat di Laboratorium Farmasi Dasar Fakultas Kesehatan Universitas Muhammadiyah Gresik.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam identifikasi rhodamin-b adalah sampel lip tint yang terdiri dari 4 merk berbeda, rhodamin-b kit, rhodamin-b baku, larutan amonia (NH_3), n-butanol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$), etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), benang wol, kloroform (CHCl_3), amonia (NH_3) 2 %, etanol 70%, asam asetat (CH_3COOH), aquadest.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam identifikasi rhodamin-b adalah neraca analitik (*centarus scale*), miligram balance (*pgb*), tabung reaksi beserta rak tabung (*herma*), beaker glass (*herma*) 100 mL, kaca arloji, pipet tetes, gelas ukur (*herma*) 50 mL, corong gelas 50 mL, waterbath (*HH-6*), cawan penguap, kertas saring, batang pengaduk, chamber (*DHG*), pipet kapiler, plat KLT, hair dryer (*miyako*), dan lampu UV.

3.3 Cara Penelitian

3.3.1. Sampling

Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah seluruh sediaan lip tint Mahasiswi Farmasi Universitas Muhammadiyah Gresik. Adapun total populasi adalah 9 merk, dengan sampel sebanyak 4 merk lip tint yang sering digunakan. Sampel dihitung dengan menggunakan rumus n-plan, sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
&= \sqrt{\text{Populasi}} + 1 \\
&= \sqrt{n} + 1 \\
&= \sqrt{9} + 1 \\
&= 4
\end{aligned}$$

Keterangan :

Jadi sampel yang diambil dalam penelitian ini ada 4 merek dengan kode A, B, C, dan D. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik non random yaitu *purposive sampling*. *Purposive sampling* merupakan pengambilan sampel berdasarkan penilaian sendiri yang didasarkan pada pertimbangan tertentu oleh peneliti, sampel dapat dikatakan memenuhi kriteria inklusi jika sampel lip tint berwarna merah dan merupakan merek yang paling banyak digunakan oleh Mahasiswi Farmasi Universitas Muhammadiyah Gresik (Sa'ad dkk, 2019).

3.3.2. Uji Rhodamin-B Kit

Diambil sampel sebanyak kurang lebih 1 mL dengan menggunakan pipet tetes dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dimasukkan pereaksi 1 sebanyak 3-5 tetes dan dihomogenkan (dikocok), setelah itu ditambahkan dengan pereaksi 2 sebanyak 5 tetes lalu dihomogenkan kembali. Kemudian dilakukan pengadukan dengan menggunakan spatula dan diamati perubahan warna. Jika dalam beberapa menit dipermukaan atas sampel bewarna menjadi ungu kemerahan spesifik, maka sampel mengandung rhodamin-b (Teskit.id, 2022).

3.3.3. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Febrianti dan Muhammad (2018), pengujian rhodamin-b menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan dua plat KLT ukuran 10 cm × 20 cm, sebagai berikut :

a. Penyiapan Fase Gerak

Perbandingan fase gerak yang dipakai adalah n-butanol : etil asetat : amonia (10 : 4 : 5).

b. Pembuatan Larutan Baku Rhodamin-B

Sebanyak 0,5 mg rhodamin-b ditimbang dan dilarutkan dalam aquadest 100 mL (Riyanti dkk, 2018).

c. Uji Rhodamin-B

Ditimbang 1 gram sampel, kemudian dilakukan penotolan sampel pada plat KLT. Plat KLT yang digunakan berukuran 10 cm × 20 cm, kemudian sampel yang sudah ditotolkan didiamkan sampai mengering lalu dimasukkan kedalam chamber yang sudah dilakukan penjenjuran dengan fase gerak n-butanol:etil asetat:amonia (10:4:5). Setelah plat KLT terelusi sempurna, plat diangkat dan dilakukan pengeringan. Kemudian diamati perubahan warna yang terbentuk, bercak akan bewarna jingga jika diamati dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan akan bewarna merah muda pada sinar UV 366 nm. Pada pengujian ini digunakan perbandingan fase gerak n-butanol:etil asetat:amonia (5:2:3).

d. Hasil Uji

Hasil dapat dinyatakan positif jika jarak antara baku pembanding dan sampel sama, atau saling mendekati (Sa'ad dkk, 2019). Menurut penelitian yang dilakukan Hangin dkk (2022) nilai Rf baku pembanding rhodamin B adalah sebesar 0,921.

3.3.4. Uji Pewarnaan/ Uji Kualitatif

Menurut Standar Nasional Indonesia No. 01-2895 tahun 1995, uji ini dilakukan dengan cara benang wol dididihkan dengan aquadest dan dikeringkan. Kemudian dicuci dengan kloroform, dan dibilas dengan menggunakan aquadest dan dikeringkan kembali. Sampel dilakukan penimbangan sebanyak 10 gram dan dipanaskan dalam 10 mL larutan amonia 2 % (dalam etanol 70%) selama 30 menit dan dilakukan penyaringan. Kemudian filtrat diuapkan diatas penangas air. Residu dilarutkan pada 10 mL air

yang mengandung asam (10 mL air dicampurkan 5 mL asam asetat 10 %). Lalu benang wool dimasukkan dalam larutan asam dan dilakukan pendidihan selama 10 menit. Kemudian benang wool diangkat, dan zat warna akan mewarnai benang wool tersebut. Setelah itu dilakukan pencucian dengan menggunakan air. Jika sampel mengandung rhodamin-B, maka setelah dicuci dengan air mengalir masih terdapat warna merah pada benang wool dan ditandai dengan warna merah yang tidak dapat menghilang (Laksmi dkk, 2018).

3.4 Analisis Hasil

3.4.1. Uji Rhodamin-B Kit

Dilakukan pengamatan pada perubahan warna yang terbentuk, jika warna yang terbentuk merah bata kembali muncul atau menguat intensitasnya, maka terdapat kandungan rhodamin-b pada sampel. Sebaliknya jika tidak ada perubahan warna yang terbentuk maka sampel tidak mengandung rhodamin-b atau negatif (Masthura, 2019). Hasil pengujian disajikan secara deskriptif kualitatif menggunakan tabel sebagai berikut :

Tabel 3.1 Uji Rhodamin-B Kit

No.	Sampel	Warna Awal	Warna Akhir	Hasil
1.	A			
2.	B			
3.	C			
4.	D			

Keterangan : Hasil Positif (+)

Hasil Negatif (-)

3.4.2. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Menurut Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Republik Indonesia Nomor HK.

03.1.23.08.11.07331 (2011), identifikasi kandungan rhodamin-b melalui KLT sebagai berikut :

- a. Hitung nilai Rf pada setiap bercak noda
- b. Bandingkan nilai Rf dengan warna bercak noda pada pengamatan secara visual yang diperoleh dari larutan baku dan larutan uji.
- c. Amati bercak rhodamin-b dibawah lampu UV, jika bercak bewarna terang maka menunjukkan adanya pewarna.

Hasil dapat dinyatakan positif jika jarak antara baku pembanding dan sampel sama, atau saling mendekati. Nilai Rf dapat diketahui dengan rumus (Sa'ad dkk, 2019) :

$$Rf = \frac{\text{jarak yang di tempuh solut}}{\text{jarak yang di tempuh fase gerak}}$$

Hasil pengujian disajikan secara deskriptif kualitatif dengan cara membandingkan antara jarak sampel dengan baku pembanding. Menurut Biasa A dkk (2021), nilai Rf rhodamin B adalah sebesar 0,9.

3.4.3. Uji Pewarnaan / Uji Kualitatif

Pada uji pewarnaan inisampel positif mengandung rhodamin-b, jika setelah dicuci dengan air mengalir masih terdapat warna merah pada benang wool dan ditandai dengan warna merah yang tidak dapat menghilang (Laksmi dkk, 2018). Hasil pengujian disajikan secara deskriptif kualitatif menggunakan tabel sebagai berikut :

Tabel 3.3 Uji Pewarnaan / Uji Kualitatif

No.	Sampel	Warna Awal	Warna Akhir	Hasil
1.	A			
2.	B			
3.	C			
4.	D			

Keterangan : Hasil Positif (+)

Hasil Negatif (-)

