

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *eye shadow* yang beredar didaerah Kota Magetan.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *eye shadow* dengan merek K (tidak teregristrasi), merek L (teregristrasi), dan merek M ( teregristrasi). Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Januari tahun 2019 secara acak di daerah kota Magetan.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama adalah metode kualitatif identifikasi dan kuantitatif penetapan kadar Rhodamin B secara KLT dan Spektrofotometri UV-VIS.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan berdasarkan pola hubungan sebab akibat menjadi variabel tergantung, variabel bebas, variabel moderator, variabel terkendali, serta variabel rambang di lain pihak. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah

untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel moderator adalah variabel tergantung tetapi tidak diutamakan untuk diteliti.

Variabel moderator dalam penelitian ini adalah dengan metode KLT dan Spektrofotometri UV-VIS untuk penetapan kadar. Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh penelitian lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah suhu dan alat percobaan. Variabel rambang adalah variabel yang pengaruhnya terhadap variabel tergantung tidak menimbulkan perbedaan yang berarti, sehingga dapat diabaikan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *eye shadow* yang dianalisa. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar Rhodamin B yang terkandung dalam sampel.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, *eye shadow* atau perona kelopak mata adalah salah satu kosmetik yang penggunaan di kelopak mata dan di bawah alis. Kosmetik ini digunakan dengan tujuan untuk membuat mata lebih terlihat menarik. *Eye shadow* merupakan sediaan kosmetik yang berisi pigmen warna.

Kedua, Rhodamin B yaitu adalah pewarna berupa serbuk kristal berwarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, serta mudah larut dalam larutan warna merah terang berfluoresensi digunakan sebagai bahan pewarna tekstil, cat, kertas atau pakaian.

Ketiga, spektrofotometri UV-VIS adalah spektrofotometri UV-VIS Shimadzu UV-1800 yang digunakan untuk analisa kuantitatif kadar Rhodamin B pada penjang gelombang 544 nm menggunakan methanol sebagai blangko.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometri UV-VIS Shimadzu tipe UV-1800, *beaker glass* Pyrex<sup>®</sup>, pipa kapiler, *chamber*, batang pengaduk, spatel, kertas perkamen, bunsen, corong Pyrex<sup>®</sup>, kertas saring *whatman*, lampu UV 254, gelas ukur Pyrex<sup>®</sup>, mikropipet, vial, pipet tetes, neraca analitik *Ohaus*, dan labu takar Pyrex<sup>®</sup>.

#### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel *Eyeshadow*, silika gel GF 254, senyawa baku rhodamin B, N-butanol, etil asetat, amonia 25%, metanol, asam klorida 4N, paraffin cair, natrium sulfat anhidrat.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Pengumpulan sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sampel yang terdapat di berbagai toko yang tersebar di kota Magetan. Sampel yang digunakan adalah 3 *Eye shadow* dari merek yang berbeda. Sampel yang dipilih dalam penelitian ini adalah sampel *Eye shadow* yang berwarna kemerahan.

## 2. Preparasi sampel

Sejumlah lebih kurang 500 mg sampel ditambahkan 0,5 asam klorida 4 N, ditambah 1 mL paraffin cair, ditambah 8,5 ml metanol, lalu dilelehkan pada penangas air, kemudian disaring dengan kertas saring. Larutan asam klorida berfungsi untuk mendestruksi senyawa-senyawa atau memecah ikatan. Na sulfat anhidrat berfungsi untuk memurnikan hasil dengan menyerap air. Metanol berfungsi sebagai pelarut Rhodamin B.

## 3. Analisis kualitatif (KLT)

Analisis kualitatif penelitian ini menggunakan KLT. Tahap identifikasi sampel dengan KLT yaitu menggunakan silika gel GF 254 yang berukuran 8 x 4 cm. Kemudian sampel ditotolkan menggunakan pipa kaliper yang sudah dibersihkan menggunakan alkohol. Sampel ditotolkan pada plat KLT dengan jarak pada jarak 1,5 cm dari bagian bawah plat, jarak antara noda adalah 2 cm. Kemudian dibiarkan beberapa saat hingga mengering. Setelah mengering plat KLT dimasukan pada chamber yang sudah dijenuhkan menggunakan fase gerak. Plat KLT dimasukkan kedalam chamber hingga terelusi sempurna. Setelah itu dikeringkan, dan selanjutnya diamati menggunakan sinar UV 254 nm. Apabila secara visual noda berwarna merah jambu dan dibawah sinar UV 254 nm berfluoresensi kuning atau orange, hal ini menunjukkan adanya rhodamin B, maka hitung harga Rf.

**3.1. Pembuatan larutan baku untuk KLT 1100 ppm.** Menimbang sejumlah 11 mg pewarna Rhodamin B baku pembanding dilarutkan dalam 10 mL methanol.

**3.2. Pembuatan fase gerak.** Fase gerak yang digunakan yaitu N-butanol: Etil asetat: amonia 25 % dengan perbandingan 20:55:25 v/v/v.

#### **4. Analisis Kuantitatif (Spektrofotometri UV-VIS)**

**4.1. Larutan Baku Rhodamin B 170 ppm (1000mg/L).** Menimbang dengan seksama Rhodamin B sebanyak 8,5 mg dilarutkan dalam Methanol sebanyak 50 ml.

**4.2. Penentuan panjang gelombang maksimum.** Baku Rhodamin B 170 ppm dipipet 0,175 mL atau 175  $\mu$ L kemudian masukan labu takar 10 mL tambahkan metanol samapai tanda batas. Setelah itu dimasukkan kedalam kuvet  $\pm$  4 mL kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 400 – 700 nm dengan interval 1 nm. Setelah panjang gelombang maksimum diketahui kemudian dilakukan penentuan *operating time*

**4.3. Penentuan *operating time*.** Baku Rhodamin B 170 ppm dipipet 0,2 mL dimasukkan kedalam labu takar 10 mL kemudian ditambahkan methanol ad tanda batas. Kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum, dalam rentang waktu 1-30 menit dengan interval waktu 1 menit.

**4.4. Penentuan Kurva Baku.** Penentuan kurva baku dilakukan dengan dibuat seri konsentrasi dari baku Rhodamin B 170 ppm, sebagai berikut 2,55 ppm; 3,40 ppm; 4,25 ppm; 5,10 ppm; 5,95 ppm; dan 6,80 ppm. Kemudian mengukur serapan masing-masing konsentrasi dari data *operating time* dan panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Mencatat semua data dan membuat persamaan garis linier.

**4.5. Penentuan larutan sampel.** Menimbang dengan seksama sampel *Eyeshadow* 4 mg untuk sampel K, 10 mg untuk sampel L dan M; lalu dimasukkan ke dalam gelas *beaker* ditambah 0,5 HCl 4 N; 1 mL paraffin cair; seujung spatel Na sulfat anhidrat; dan 8,5 mL metanol. Kemudian dipanaskan diatas api bunsen sambil diaduk sampai homogen. Larutan disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditepatkan volumenya hingga 10 mL. Larutan dihomogenkan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis.

#### E. Analisis Hasil

Metode analisa hasil yang dipakai pada penentuan uji kualitatif yaitu dengan menggunakan nilai Rf yang dihitung dari jarak tempuh bercak dibagi jarak tempuh fase gerak. Hasil perhitungan nilai Rf sampel lalu dibandingkan dengan nilai Rf pembanding yaitu baku Rhodamin B.

Rumus perhitungan nilai Rf :

$$Rf = \frac{\text{Jarak tempuh bercak}}{\text{Jarak tempuh fase gerak}}$$

Sedangkan untuk analisa kuantitatif menggunakan metode regresi linear. Metode regresi linear didapatkan dari pembuatan kurva kalibrasi antara konsentrasi dan serapan yang diperoleh dengan menggunakan lamda maksimum yang diketahui, dengan persamaan  $y = a + bx$ .

Validasi metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah presisi, akurasi, linearitas, LOD, dan LOQ. Perhitungan presisi bertujuan untuk menentukan koefisien variasi (CV) yang dapat dihitung dengan rumus :

$$CV = \frac{SD}{X} \times 100 \%$$

Hasil presisi yang baik adalah ketika nilai CV atau simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%. Nilai akurasi dinyatakan sebagai prosentasi perolehan kembali atau *recovery* yang baik harus memenuhi 80 – 120 %. Linearitas dihitung menggunakan persamaan regresi linear  $y = a + bx$ . Hasil linearitas dikatakan baik jika linearitas mendapat hasil korelasi (R) mendekati 1.

LOD merupakan parameter untuk menentukan kadar terkecil dari sampel tetapi tidak dapat dikuantifikasi secara tepat. Sedangkan LOQ merupakan kadar terkecil dari sampel yang dapat dianalisis dan dihitung.

Nilai LOD dihitung dengan rumus :

$$\text{LOD} = \frac{3 \times SD}{\text{Slope}}$$

Nilai LOQ dihitung dengan rumus :

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times SD}{\text{Slope}}$$

Penentuan kadar sampel dengan cara nilai absorbansi yang diperoleh dari sampel dimasukkan kedalam persamaan kurva baku, kemudian dihitung menggunakan persamaan :

$$\text{Rumus} = \frac{\text{konsentrasi sampel} \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \text{faktor pembuatan} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat penimbangan}} \times 100\%$$