

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan bagian yang berisi semua obyek menjadi sasaran penelitian, sedangkan sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang dipergunakan dalam penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah *body lotion* yang tidak tertuliskan pengawet metilparaben yang dijual di online shop. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 produk *body lotion* yang mempunyai volume 60-100 mL dengan rentang harga kurang dari Rp20.000.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama merupakan bagian yang berisi identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama dalam penelitian ini adalah kadar metylparaben dalam sampel *body lotion* yang ditetapkan dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi variabel utama dibagi menjadi 2 yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi terjadinya perubahan. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi karena adanya variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel *body lotion*. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah hasil uji analisis kadar metylparaben dalam *body lotion* yang dijual di online shop.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, metylparaben adalah salah satu golongan pengawet yang sering digunakan dalam kosmetik dan memiliki fungsi sebagai pencegah pertumbuhan mikroorganisme atau bakteri dalam produk kosmetik sehingga dapat tahan lebih lama.

Kedua, *body lotion* adalah salah satu sediaan kosmetik yang kini sering digunakan oleh masyarakat yang dimaksudkan untuk pelembab bagi kulit yang

termasuk dalam golongan emolien (pelembut) dan mempunyai beberapa sifat yaitu sebagai sumber untuk melembabkan kulit, pelindung kulit, dan menjadikan kulit tangan serta badan menjadi lebih lembut serta mudah diaplikasikan pada kulit.

Ketiga, Kromatografi cair kinerja tinggi adalah metode pemisahan yang dapat digunakan untuk analisis multikomponen karena dapat memisahkan dan mengidentifikasi senyawa dalam sampel yang merupakan campuran, selain itu metode KCKT adalah metode yang memberikan sensitivitas dan selektivitas yang lebih tinggi.

Keempat, Online shop adalah sebuah toko online yang melakukan kegiatan jual beli barang atau jasa yang dilakukan melalui internet, transaksi yang dilakukan yaitu dengan tanpa adanya tatap muka langsung antara penjual dan pembeli. Kegiatan transaksi pada online shop dapat dilakukan dengan mudah dan dapat dilakukan kapan saja dan dimana saja menggunakan perangkat yang terhubung dengan internet.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *HPLC Shimadzu SPD-20A*, Spektrofotometri Uv-Vis, timbangan analitik, alat-alat kaca, sonikator, mikro filter 0,45 μm , kertas saring, batang pengaduk, spatula.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 sampel sediaan *body lotion* mengandung metilparaben yang dijual di online shop, metilparaben p.a, HCl, metanol, dan akuabides.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan sampel

Dikumpulkan sebanyak 3 sampel *body lotion* yang mengandung metilparaben dengan merek yang berbeda yang dijual di online shop.

2. Analisis kualitatif metode Kromatografi Lapis Tipis

1.1. Preparasi sampel

Ditimbang seksama sebanyak 1 gram sampel, dilarutkan dengan metanol, diaduk hingga homogen, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas kemudian saring menggunakan kertas saring (Mustapa *et al*, 2024).

1.2. Pembuatan larutan standar

Ditimbang seksama sebanyak 50 mg metilparaben, dimasukkan dalam labu tentukur 50 mL dan ditambahkan metanol pa sampai tanda batas, kocok hingga homogen.

1.3. Penyiapan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Dalam penelitian ini digunakan fase diam berupa lempeng silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah toluen dan asam asetat glasial (80:20). Fase gerak dijenuhkan terlebih dahulu dalam *chamber* dengan menggunakan kertas saring (Mustapa *et al*, 2024)

1.4. Penotolan pada lempeng KLT

Lempeng silika gel 60 GF₂₅₄ yang digunakan diberi garis batas atas dan bawah 1 cm. Pada garis bawah diberi identitas sampel yang akan ditotolkan dengan jarak penotolang 2 cm pada masing-masing sampel dan larutan standar kemudian larutan ditotolkan. Setelah semua sampel dan larutan ditotolkan pada lempeng KLT, kemudian dimasukkan dalam bejana elusi yang berisi fase gerak dan sudah dijenuhkan. Keluarkan lempeng KLT apabila jarak rambat fase gerak telah mencapai batas garis atas, kemudian keringkan. Amati bercak pada lampu UV 254 nm (Nikmah *et al*, 2021).

3. Analisis kuantitatif metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

3.1. Preparasi sampel

Ditimbang seksama sebanyak 1 gram sampel, ditambahkan metanol p.a dimasukkan labu ukur 10 mL. Disaring menggunakan kertas whatmann No.41. Ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas dan disonikasi selama 10 menit.

3.2. Pembuatan fase gerak

Pembuatan fase gerak dibuat dari campuran metanol dan aquabides dengan perbandingan 6:4. Fase gerak disonikasi selama 30 menit. (Nikmah *et al*, 2021). Penggunaan fase diam pada alat KCKT digunakan Kolom C18 yang mempunyai sifat nonpolar karena fase gerak yang digunakan metanol mempunyai sifat polar.

3.3. Pembuatan larutan standar metilparaben.

Ditimbang seksama 50 mg metilparaben, dilarutkan dengan metanol, setelah larut dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Diencerkan baku dengan memipet 1 mL dari baku 1000 ppm dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan metanol sampai tanda batas sehingga didapatkan larutan standar dengan konsentrasi 100 ppm (Nikmah *et al*, 2021).

3.4. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara *scanning* serapan larutan standar metilparaben dengan konsentrasi 7 µg/mL pada panjang gelombang 200-400 nm (Nikmah *et al*, 2021).

3.5. Pembuatan kurva standar

Pada pembuatan kurva standar dilakukan dengan membuat seri konsentrasi 4,96 ; 9,92 ; 14,88 ; 19,84 dan 24,8 ppm. Seri konsentrasi tersebut secara berurutan dilakukan pemipetan larutan sebanyak 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL dan 2,5 mL kemudian masing-masing ditambahkan metanol ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Sebelumnya larutan tersebut disaring menggunakan mikro filter 0,45 µm, dan disonikasi selama 20 menit (Dhurhanian, 2019). Setelah disaring, diinjeksikan sebanyak 20 µL dengan kecepatan alir fase gerak 1,5 mL/menit (BPOM, 2011).

3.6. Penetapan kadar

Penetapan kadar ini dilakukan dengan memipet larutan hasil penyiapan sampel yang sebelumnya disaring menggunakan mikro filter 0,45 μm , dan disonikasi selama 20 menit (Nikmah *et al*, 2021). . Diinjeksikan dalam sistem KCKT dengan volume injeksi 20 μL dan laju alir 1,5 mL/menit (BPOM, 2011).

4. Verifikasi Metode Analisis

Verifikasi metode analisis ini berguna untuk memastikan bahwa metode analisis dapat diterapkan dengan baik dan mampu menjamin mutu hasil pengujian. Verifikasi metode ini mempunyai tujuan untuk memastikan bahwa laboratorium yang digunakan dapat melakukan pengujian metode uji dengan hasil yang valid (Sukaryono *et al*, 2017). Pengawet dalam Farmakope Indonesia Ed VI termasuk dalam kategori 1 yaitu prosedur analisis untuk penetapan kadar komponen utama dalam bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) dalam sediaan obat jadi sehingga parameter uji yang dilakukan adalah akurasi, presisi, linearitas dan spesifisitas.

4.1. Uji Linearitas

Linearitas dalam suatu prosedur analitik merujuk pada kemampuan metode tersebut dalam rentang tertentu untuk menghasilkan data yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam sampel. Tingkat linearitas ini biasanya dinyatakan melalui nilai koefisien korelasi (r) dimana untuk analisis komponen utama, nilai r yang dibutuhkan adalah lebih dari 0,999 (Prasasty, 2019) . Larutan baku dengan konsentrasi 99,2 ppm dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 4,96 ; 9,92 ; 14,88 ; 19,84 dan 24,8 ppm. Linearitas diperoleh dengan memplotkan hubungan antara konsentrasi dengan AUC (*Area Under Curve*) sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y = a + bx$ (Megasari *et al*, 2022).

4.2. Akurasi

Pada pengujian akurasi ini menggunakan metode penambahan baku (standars addition) atau metode adisi dengan penambahan dua konsentrasi standar yang berbeda. Akurasi ditentukan dengan membuat seri konsentrasi pada kurva baku yaitu 4,96 ; 14,88 dan 24,8 ppm. Masing-masing diambil 1,0 mL, kemudian dicampur dengan 1,0 mL salah satu larutan sampel ke dalam vial dan homogenkan (Herdini & Wahyudiana, 2019). Masing-masing diinjeksikan sebanyak 3 kali pada

sistem HPLC, kemudian ditetapkan kadarnya berdasarkan persamaan dari kurva baku yang diperoleh (Kinanti, 2021).

4.3. Presisi

Presisi merupakan suatu kedekatan hasil pengukuran analisis contoh yang sama yang dilakukan secara berulang-ulang. Penentuan ketelitian ini sebagai simpangan baku (SD) dan %RSD (*Relative Standar Deviation*). Keseksamaan dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatbility*) atau ketertiruan (*reproducibility*) (Kinanti, 2021). Hasil uji dikatakan seksama jika diberikan nilai simpang baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Sa'diyah *et al*, 2023). Presisi dilakukan dengan membuat seri konsentrasi 14,88 ppm sebanyak 6 kali replikasi. Masing-masing diinjeksikan pada sistem HPLC (Megasari *et al*, 2022).

4.4. Spesifisitas

Pada uji ini dilakukan dengan menginjektikan semua sampel dan baku pada alat KCKT kemudian dibandingkan hasil waktu retensi antara baku dan sampel.

E. Analisis Hasil

Hasil analisis dilakukan dengan cara membandingkan hasil kadar tiap sampel dengan kadar maksimum metilparaben sesuai dengan syarat PerBPOM Nomor 23 Tahun 2019 Tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika. Hasil kadar yang didapat memenuhi persyaratan atau tidak.