

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah toner wajah bersertifikat BPOM dan tidak bersertifikat BPOM yang didapat dari toko *online* yang pada kemasannya mencantumkan informasi tentang komposisi *methylparaben*.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 produk toner wajah kemasan botol bersertifikat BPOM dan tidak bersertifikat BPOM yang didapat dari toko *online* yang pada kemasannya mencantumkan informasi tentang komposisi *methylparaben*.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kadar nipagin dalam sampel toner yang ditetapkan dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini dibagi menjadi tiga, yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang memengaruhi atau menyebabkan terjadinya perubahan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel kosmetik toner wajah.

Variabel terkendali adalah variabel yang dijaga tetap konstan oleh peneliti. Variabel terkendali dalam penelitian ini mencakup suhu, pelarut, preparasi sampel, konsentrasi bahan, dan peralatan laboratorium yang digunakan.

Sementara itu, variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh perubahan variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar nipagin dalam toner.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Toner adalah sediaan kosmetik yang memiliki berbagai fungsi, seperti pembersih, penyegar dan penyeimbang pH pada wajah, toner yang diuji adalah toner yang mengandung nipagin. .

Kedua, nipagin adalah pengawet yang berfungsi sebagai antibakteri dan sering digunakan dalam produk kosmetik untuk mencegah kontaminasi bakteri.

Ketiga, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merupakan salah satu metode analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi, memisahkan dan mengukur komponen dalam sampel berdasarkan interaksi dengan fase diam dan fase gerak.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah seperangkat alat KCKT fase terbalik (Shimadzu LC20A) dengan detector UV, kolom C18 dimensi $250 \times 4,6$ mm dan ukuran pori $5 \mu\text{m}$ (Shimadzu SPD20A), *ultrasonic* (biobase), spektrofotometer UV-Vis (shimadzu UV-Vis 1280), timbangan analitik (ohaus), kertas saring whattman no. 41, mikro filter $0,45\mu\text{m}$ dan $0,22\mu\text{m}$, pipet kapiler, bejana elusi, lempeng silika gel 60 F254 (merck), pipet tetes.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metilparaben p.a, metanol p.a, aquades, 3 sampel toner wajah yang beredar di online shop.

D. Jalannya Penelitian

1. Analisis Kualitatif dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Dibandingkan waktu retensi dari puncak larutan baku dengan waktu retensi puncak pada kromatogram masing-masing sampel. Jika waktu retensi sampel mendekati waktu retensi larutan baku nipagin, maka puncak tersebut dapat diidentifikasi sebagai senyawa nipagin.

2. Analisis Kuantitatif dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.1. Penyiapan sampel . Dipipet sebanyak 2 mL sampel, dimasukkan kedalam labu takar 10 mL, ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas, disaring menggunakan kertas saring whatmann No. 41.

2.2. Pembuatan fase gerak 500 mL. Fase gerak dibuat dari campuran metanol dan aquabides dengan perbandingan 6:4. dan disonikator selama 30 menit.

2.3. Pembuatan larutan standar metilparaben. Ditimbang seksama sebanyak 50 mg metilparaben, dimasukan dalam labu takar 50 mL, dilarutkan dalam metanol sebanyak 50 mL, dihomogenkan. Diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya dipipet sebanyak 5 mL dari larutan baku 1000 ppm kedalam labu ukur 50 mL, ditambahkan metanol hingga tanda batas, maka didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm.

2.4. Penentuan panjang gelombang maksimum. Dibuat larutan baku konsentrasi 7 ppm dengan memipet 0,7 mL dari konsentrasi baku 100 ppm, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, ditambahkan metanol sampai tanda batas. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara scanning serapan larutan pada panjang gelombang 200-400 nm. Berdasarkan FI edisi IV, nipagin memiliki panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sekitar 272 nm.

2.5. Pengamatan waktu retensi. Pengamatan waktu retensi dilakukan dengan cara menginjeksikan 20 μ L larutan standar metilparaben dengan kecepatan laju alir 1,2 mL/menit.

2.6. Pembuatan kurva standar. Dibuat seri konsentrasi yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm. Diambil sesuai seri konsentrasi dengan memipet larutan sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL secara berurutan dan diencerkan dengan metanol masing-masing hingga 10 mL atau hingga tanda batas. Kemudian disaring menggunakan kertas saring mikrofilter 0,22 μ m dan disonikator selama 20 menit (Dhurhanian, 2019).

3. Uji Validasi

3.1. Selektifitas. Penentuan selektivitas dilakukan dengan membandingkan waktu retensi hasil kromatogram larutan standar metilparaben dengan konsentrasi 20 ppm terhadap waktu retensi yang dihasilkan dari kromatogram masing-masing sampel, yaitu sampel B, H, dan R. Penilaian ini dilakukan dengan membandingkan larutan standar baku dengan larutan sampel untuk memastikan apakah kandungan dalam sampel sesuai dengan yang terdapat dalam larutan baku (Maghfiroh *et al.*, 2022)

3.2. Linearitas. Ditentukan dengan membuat 5 seri konsentrasi sebesar 5, 10, 15, 20, 25 ppm dengan cara memipet larutan baku 100 ppm sebanyak 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; 2,5 mL kemudian dimasukkan masing-masing kedalam labu takar 10 mL dan ditambahkan methanol hingga tanda batas dan dihomogenkan. Masing- masing konsentrasi dibaca dan hasil luas area yang diperoleh dianalisis dengan membuat persamaan regresi linear dan ditentukan koefisien korelasinya (r). Syarat keberterimaan uji linearitas menurut SNI yaitu (r) 0,995, menurut ICH (r) $\geq 0,998$, dan menurut AOAC (r) $> 0,995$.

3.3. Presisi. Ditentukan dengan membuat seri konsentrasi 20 ppm sebanyak 6 replikasi. Dipipet sebanyak 2 mL dari konsentrasi larutan stok 100 ppm dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL. Ditambahkan metanol hingga tanda. Hasil uji metode dianggap seksama jika diberikan nilai simpang baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Setyawan, 2018).

3.4. Akurasi. Ditentukan dengan cara membuat seri konsentrasi yang diambil dari 3 konsentrasi pada kurva baku yaitu 10, 15, dan 20 ppm dengan memipet larutan stok nipagin 100 ppm dipipet 1; 1,5, dan 2 mL dan masing-masing dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL lalu ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Masing-masing konsentrasi dibuat sebanyak 3 kali replikasi. Syarat hasil konsentrasi yaitu 98%-102%.

4. Penetapan kadar nipagin

Memipet 2 mL sampel, dimasukkan kedalam labu takar 10 mL, ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas, dipipet kembali 5 mL, dimasukkan

ke dalam labu takar 10 mL, ditambahkan metanol hingga tanda batas, disaring dengan kertas Whatman no 41, disaring dengan mikro filter 0,22 μm dan disonikator selama 20 menit, diinjeksikan sejumlah 20 μL dan kecepatan alir fase gerak 1,2 mL/menit. Diperoleh hasil berupa kromatogram dan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Kromatogram tersebut diperoleh nilai AUC (*Area Under Curve*) yang dapat dimasukkan dalam perhitungan persamaan regresi linier sehingga diperoleh kadar masing-masing sampel (Dhurhanian, 2019).

1. Analisis Hasil

Analisis kadar nipagin dalam toner dilakukan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Data yang diperoleh berupa nilai AUC dari kromatogram sampel, kemudian dihitung menggunakan persamaan regresi linier kurva baku untuk dapatkan kadar nipagin dalam persen.

1. Regresi linier

$$y = a + bx$$

Keterangan :

y : nilai AUC yang diperoleh

x : konsentrasi nipagin (mg/mL)

a : konstanta

b : koefisien regresi

2. Perhitungan kadar (%)

$$\% \text{ kadar} = \frac{\text{konsentrasi nipagin (g/mL)} \times v_p \times f_p}{\text{volume sampel (mL)}} \times 100\%$$

Keterangan :

V_p : volume pembuatan larutan (mL)

F_p : factor pengencer