

## **BAB IV**

### **PROSEDUR PENELITIAN**

#### **4.1. Pengumpulan Sampel**

Krim pemutih wajah diperoleh dari beberapa toko kosmetik yang berada di kota Bandung. Pengambilan sampel dilakukan berdasarkan ketidaklengkapan informasi atau keterangan yang seharusnya dicantumkan dalam etiket wadah dan atau pembungkus.

#### **4.2. Uji Kesesuaian Sistem**

Uji kesesuaian sistem dilakukan terhadap larutan baku asam retinoat pada salah satu konsentrasi, kemudian disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ l ke dalam alat KCKT pada kondisi optimum sebanyak 7 kali pengukuran. Dari kromatogram yang diperoleh ditentukan keterulangan penyuntikan larutan baku yang dinyatakan dengan SBR (simpangan baku relatif) dari waktu retensi dan luas area, *taily* faktor dan asimetri puncak kromatogram.

#### **4.3. Kinerja Analitik**

Kinerja analitik atau verifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, dan presisi.

##### **4.3.1. Linearitas**

Data linieritas diperoleh dari data kurva baku konsentrasi asam retinoat pada kisaran konsentrasi yang dipilih untuk uji linieritas, kemudian diukur

menggunakan KCKT. Dari hasil pengukuran dihitung koefisien kolerasi, standar deviasi dan koefisien variansi.

#### 4.3.2. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi dihitung dari data kurva baku standar asam retinoat dengan rumus:

$$BD = \frac{3 \times Sb}{SI} \quad (1)$$

$$BK = \frac{10 \times Sb}{SI} \quad (2)$$

**Keterangan :**

**BD** = batas deteksi (*limit of detection/LOD*)

**BK** = *batas kuantitasi (limit of quantification/LOQ)*

**Sb** = simpangan baku

**SI** = slope (kemiringan) = b

#### 4.3.3. Akurasi

Pengukuran dengan metode standar adisi, dimana masing-masing pengukuran dilakukan secara triplo. Kemudian dihitung persen perolehan kembalinya (*% recovery*).

#### 4.3.4. Presisi

Pengukuran dengan metode standar adisi, dimana pengukuran dilakukan sebanyak 6 kali. Kemudian dihitung simpangan baku relatifnya (*% SBR*).

### 4.4. Analisis Asam Retinoat dengan KLT

#### 4.4.1. Penyiapan larutan baku

Ditimbang lebih kurang 10 mg baku pembanding asam retinoat, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu dilarutkan dan diencerkan dengan metanol sampai tanda (BPOM, 2011).

#### 4.4.2. Penyiapan larutan uji

Ditimbang lebih kurang 3 g sampel, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah dibungkus dengan aluminium foil, ditambahkan 10 mL metanol ke dalamnya dan dicampur menggunakan *vortex mixer* selama 5 menit. Kemudian didinginkan dalam penangas es selama 15 menit dan disaring melalui kertas saring *Whatman* no. 41 (BPOM, 2011).

#### 4.4.3. Penyiapan larutan pengembang

Disiapkan larutan n-heksan dan aseton dengan perbandingan 6:4 kemudian dicampurkan ke dalam sebuah bejana. Lalu dilakukan penjenuhan dengan kertas saring dan bejana ditutup dengan kertas aluminium foil (BPOM, 2011).

#### 4.4.4. Analisis sampel dengan KLT

Disiapkan pelat KLT dengan dibuat batas penotolan dan batas elusi masing-masing 1 cm dari ujung pelat. Kemudian pada pelat KLT ditotolkan secara terpisah, masing-masing larutan uji dan larutan baku ditotolkan pada batas penotolan dari pelat KLT. Setelah itu pelat dikembangkan dalam bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang. Pelat KLT diangkat dan dibiarkan hingga kering. Bercak gelap diamati di bawah penyinaran lampu UV 254 nm (BPOM, 2011).

## **4.5. Analisis Asam Retinoat dengan KCKT**

### **4.5.1. Penyiapan larutan baku**

Ditimbang lebih kurang 10 mg baku standar asam retinoat, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, dan dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan baku asam retinoat 1000 ppm. kemudian larutan stok ini dibuat pengenceran bertingkat hingga diperoleh larutan baku standar dengan rentang konsentrasi 0,5 hingga 50 ppm.

### **4.5.2. Penyiapan larutan uji**

Ditimbang lebih kurang 1 g sampel, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah dibungkus aluminium foil, lalu ditambahkan 10 mL metanol dan dicampur menggunakan *vortex mixer* selama 5 menit. Setelah itu didinginkan dalam penangas es selama 15 menit (BPOM, 2011).

### **4.5.3. Penyiapan larutan uji dengan SPE**

Hasil ekstraksi uji diambil fase metanolnya untuk dilakukan ekstraksi menggunakan SPE (*Solid Phase Extraction*). Ekstraksi dengan SPE dilakukan dengan 4 tahap, yaitu pelarut metanol dituangkan ke dalam cartridge untuk pengkondisian sistem, kemudian larutan uji fase metanol dituangkan ke dalam cartridge untuk diretensi, lalu dimasukkan larutan untuk pembilasan dan setelahnya untuk elusi senyawa yang diinginkan. Fase elusi disaring melalui penyaring nilon membran filter 0,45  $\mu\text{m}$ . Filtrat dikumpulkan dalam vial berwarna coklat, beberapa mL filtrat pertama dibuang. Filtrat dalam vial coklat dijadikan sebagai larutan uji.

#### 4.5.4. Optimasi kondisi KCKT

Kromatografi cair kinerja tinggi yang digunakan adalah KCKT Agilent 1220 dengan kondisi analisis yang akan digunakan adalah sebagai berikut:

Kolom : Zorbax® C18  
Fasa gerak : metanol : akuabidestilata : asam asetat glasial (85:15:0,5)  
(dioptimasi)  
Laju alir : 1,4 mL/menit  
Detektor UV : panjang gelombang 353 nm  
Volume injeksi : 20 µL

Fase gerak dialirkan ke dalam kolom yang telah dicuci sebelumnya dengan akuabidestilata. Kemudian larutan baku asam retinoat dengan konsentrasi 10 ppm disuntikkan sebanyak 20 µl (*auto injector*) ke dalam sistem KCKT dengan komposisi fase gerak yang berbeda-beda, kemudian ditentukan perbandingan fase gerak yang dapat memberikan pemisahan optimum.

#### 4.5.5. Analisis sampel dengan KCKT

Disuntikkan secara terpisah antara larutan baku dan larutan uji ke dalam sistem KCKT melalui injektor, kemudian dibandingkan waktu retensi yang diperoleh dari kromatogram larutan uji dengan larutan baku (BPOM, 2011).