

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel ini dilakukan berdasarkan ketidaklengkapannya informasi atau keterangan yang seharusnya dicantumkan pada etiket wadah dan atau pembungkus. Dari hasil pengumpulan sampel tersebut diperoleh sebagai berikut:

- 1) Sampel A, tidak terdapat keterangan apapun kecuali nama produk
- 2) Sampel B, keterangan dibuat penulisan ulang berupa tempelan kertas HVS, tidak terdapat kode produksi (nomor *batch*), dan tidak terdapat alamat produsen atau penyalur (importir)
- 3) Sampel C, tidak terdapat nama dan alamat produsen atau penyalur, komposisi, nomor izin edar, kode produksi, bulan dan tahun produksi dan kadaluarsa
- 4) Sampel D, tidak terdapat alamat produsen atau penyalur dan kode produksi
- 5) Sampel E, tidak terdapat nama dan alamat produsen atau penyalur, komposisi, nomor izin edar, kode produksi, bulan dan tahun produksi dan kadaluarsa
- 6) Sampel F, tidak terdapat kode produksi, bulan dan tahun produksi dan kadaluarsa
- 7) Sampel G, keterangan kemasan sebagian besar bertuliskan bahasa asing, tidak terdapat ukuran berat bersih

- 8) Sampel H, tidak terdapat bulan dan tahun produksi dan kadaluarsa
- 9) Sampel I, tidak terdapat nama dan alamat produsen atau penyalur, komposisi, nomor izin edar, kode produksi, bulan dan tahun produksi dan kadaluarsa
- 10) Sampel J, tidak terdapat nama dan alamat produsen atau penyalur, ukuran berat bersih, nomor izin edar, kode produksi, bulan dan tahun produksi dan kadaluarsa
- 11) Sampel K, tidak terdapat keterangan sama sekali, kemasan hanya dalam berupa wadah salep bening

5.2. Penyiapan Larutan Uji untuk Pengujian dengan KLT

Pada analisis asam retinoat pada krim pemutih wajah ini, sampel diekstrak dengan metanol karena pelarut tersebut dapat melarutkan asam retinoat dan tidak bercampur dengan basis. Kemudian dilakukan pengocokan dengan vorteks selama 5 menit yang diharapkan dapat memisahkan asam retinoat dari basis sehingga terjadi pemisahan yang baik antara fase basis dengan fase metanol. Setelah itu dilakukan proses pendinginan dalam penangas es selama 15 menit untuk menstabilkan asam retinoat. Setelah fase basis dan fase metanol terpisahkan, fase metanol diambil untuk dilakukan pengujian dengan KLT. Fase metanol tersebut perlu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring *Whatman No.41* untuk memisahkan larutan sampel dari komponen lain yang dapat mengganggu proses analisis.

5.3. Analisis Sampel dengan KLT

Fase gerak yang digunakan dalam analisis dengan KLT ini adalah n-heksan : aseton (6:4). Campuran fase gerak dimasukkan ke dalam bejana, lalu dilakukan penjuhan dengan bantuan kertas saring yang disimpan dengan posisi tegak, kemudian bejana tersebut ditutup hingga kedap udara. Suatu bejana (*chamber*) dikatakan telah jenuh apabila kertas saring yang diletakkan tegak dalam larutan pengembang tersebut telah terbasahi semua oleh fase gerak. Tahap selanjutnya adalah meletakkan pelat KLT yang telah dilakukan penotolan larutan baku standar dengan larutan uji hingga fase gerak terelusi hingga batas elusi. Hasil dari pengujian ini pemisahan yang terjadi kurang baik, dimana bercak yang dihasilkan berekor (*tailing*). Hasil dari pengujian ini dipilih 5 buah sampel yang kemudian dilakukan analisis dengan KCKT. Pemilihan 5 buah sampel ini berdasarkan letak bercak larutan uji yang dihasilkan berdekatan dengan bercak larutan baku. Kelima sampel tersebut adalah sampel A, B, F, G, dan K.

5.4. Penyiapan Larutan Uji untuk Pengujian dengan KCKT

Penyiapan larutan uji untuk analisis asam retinoat dengan KCKT ini hampir sama dengan penyiapan larutan uji untuk analisis dengan KLT, namun proses ekstraksi sampel pada pengujian dengan KCKT dilakukan lebih lanjut. Setelah dilakukan pendinginan di dalam es selama 15 menit, fase metanol diambil kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan SPE (*solid phase extraction*). Ekstraksi menggunakan SPE ini bertujuan untuk memisahkan target analit dari matrik sampel.

Ekstraksi pada SPE ini terdapat 4 tahap, yaitu tahap pengkondisian, retensi (tertahannya) sampel, pembilasan, dan tahap elusi. Pada tahap pengkondisian sistem, pelarut yang digunakan adalah metanol. *Cartridge* dialiri dengan metanol yang bertujuan untuk menciptakan kondisi sistem yang sama dengan pelarut sampel yang digunakan. Tahap selanjutnya adalah melewatkan larutan sampel (fasa metanol) ke dalam *cartridge* untuk menahan asam retinoat, setelah itu dilakukan pembilasan dengan metanol dengan tujuan untuk mengeluarkan atau menghilangkan komponen lain yang tidak tertahan selama proses retensi oleh penjerap (sorben), dan tahap elusi digunakan pelarut campuran antara metanol : akuabidestilata : asetat glasial (90:10:0,5). Pada tahap pembilasan sebenarnya metanol dapat membuat asam retinoat keluar dari penjerap karena asam retinoat terlarut dengan metanol, namun telah dilakukan pengujian pembilasan sebelumnya menggunakan pelarut n-heksan dan pelarut metanol pada tahap elusi dengan hasil pemisahan yang kurang baik. Dimana terbentuk puncak lain yang luas areanya lebih besar dibandingkan dengan puncak asam retinoat, selain itu juga puncak asam retinoat terbentuk *tailing*. Melihat hasil pengujian tersebut pelarut yang digunakan dalam ekstraksi sampel ini adalah pelarut metanol dalam tahap pembilasan dan pelarut campuran metanol : akuabidestilata : asam asetat glasial (90:10:0,5) pada tahap elusi,

Setelah itu, sebelum semua larutan uji dan larutan standar disuntikkan ke dalam sistem KCKT, perlu dilakukan penyaringan terlebih dahulu menggunakan penyaring membran PTFE 0,45 μm untuk menyaring partikel atau komponen lain

yang kemungkinan masih terkandung dalam larutan uji dan standar sehingga kerusakan kolom dapat terhindar.

5.5. Kondisi Pengujian dengan KCKT

Analisis asam retinoat ini dilakukan dengan sistem kromatografi fase terbalik, yaitu polaritas dari fasa gerak lebih polar daripada fasa diam yang digunakan (C-18/n-oktadesil silan). Dengan sistem ini akan membuat analit yang sifat polaritasnya lebih non polar akan tertahan lebih lama pada fasa diam. Kolom C-18 lebih umum digunakan karena dapat memisahkan senyawa yang memiliki kepolaran yang tinggi, sedang dan rendah.

Asam retinoat memiliki cincin aromatik, ikatan rangkap terkonjugasi dan ausokrom anion -O sehingga dapat dideteksi dengan detektor UV pada panjang gelombang 353 nm dengan fase gerak campuran antara metanol, akuabidestilata dan asam asetat glasial.

Sebelum dilakukan analisis perlu dilakukan optimasi kondisi KCKT dengan tujuan untuk dapat memberikan hasil analisis yang baik. Metanol digunakan karena asam retinoat memiliki kelarutan yang baik pada metanol sehingga diharapkan asam retinoat dapat terelusi, selain itu juga metanol merupakan pelarut polar yang umum digunakan dalam kromatografi fase balik. Akuabidestilata digunakan sebagai fase gerak tujuannya adalah untuk membuat suasana fase gerak lebih polar. Asam asetat glasial berfungsi untuk mengendalikan keasaman sistem sehingga dapat menahan ionisasi analit. Asam

asetat glasial digunakan sebagai pemodifikasi kolom silika yang bertujuan untuk mengurangi ekor puncak senyawa asam (Munson, 1991).

Pada pengujian pertama dilakukan penyuntikan larutan baku pada konsentrasi 10 ppm dengan fase gerak metanol : akuabidetilata : asam asetat glasial dengan perbandingan 85:15:0,5. Hasil pengujian memberikan waktu retensi yang cukup lama, yaitu 16,8 menit dengan waktu analisis 20 menit dengan laju alir 1,4 mL/menit. Untuk mengurangi lamanya waktu analisis dan jumlah fase gerak yang digunakan, maka dilakukan peningkatan jumlah pelarut metanol menjadi 90:10:0,5. Peningkatan jumlah metanol dalam fasa gerak ini membuat asam retinoat terelusi dari kolom lebih cepat karena kecenderungan asam retinoat pada metanol lebih besar. Dengan perbandingan fasa gerak 90:10:0,5 ini memberikan waktu retensi 9,5 menit dengan waktu analisis 13 menit pada laju alir 1,4 mL/menit.

5.6. Uji Kesesuaian Sistem

Tahap selanjutnya adalah uji kesesuaian sistem yang bertujuan untuk mengetahui apakah kondisi KCKT sudah dapat memberikan hasil yang optimum dalam pengujian. Uji kesesuaian sistem ini dilakukan pada larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm yang disuntikkan ke dalam sistem KCKT sebanyak 7 kali. Dari pengujian ini dihasilkan kromatogram yang memiliki nilai simpangan baku relatif (SBR) 0,4 % dari waktu retensi dan 1,38 % dari luas area, selain itu juga dapat diketahui bahwa kromatogram yang didapatkan simetris dan tidak terbentuk *tailing*.

5.7. Kinerja Analitik

Verifikasi metode dilakukan untuk membuktikan metode analisis yang digunakan masih dapat bekerja dengan baik sehingga dapat menjamin bahwa metode analisis tersebut memenuhi persyaratan yang sesuai dengan tujuan penggunaannya. Parameter analisis yang digunakan adalah linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, dan presisi.

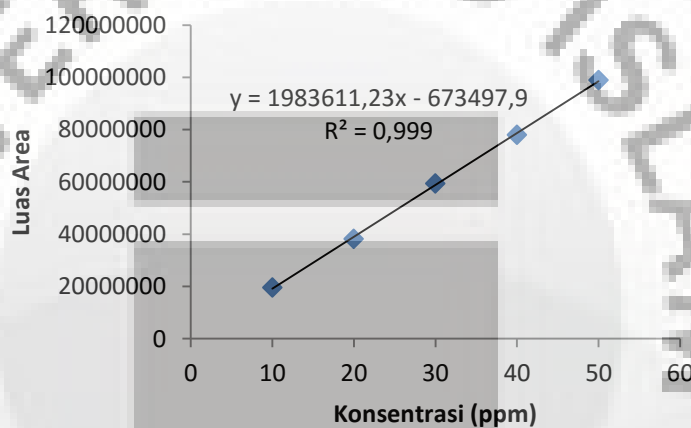
5.7.1. Linieritas

Penentuan linieritas dilakukan untuk melihat kemampuan metode analisis yang digunakan dapat memberikan respon yang baik pada berbagai macam konsentrasi analit pada suatu kurva kalibrasi untuk menghasilkan garis linier atau lurus. Pada tahap ini dilakukan penelitian terhadap baku standar untuk menentukan kurva standar hubungan konsentrasi asam retinoat dalam larutan uji atau sampel (ppm) terhadap skala pada alat KCKT. Larutan standar asam retinoat yang digunakan dalam penentuan kurva baku ini adalah larutan baku dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Dari penentuan ini diperoleh persamaan $y = 1983611,23x - 673497,9$ dengan nilai koefisien korelasi (R) 0,999. Persamaan inilah yang digunakan untuk mengetahui kadar asam retinoat dalam sampel. dari persamaan tersebut dapat diperoleh harga simpangan baku residual ($S_{y/x}$) sebesar 765645,643, standar deviasi (S_{x0} atau SD) 0,386 dan koefisien variansi (V_{x0}) 1,29%. Dilihat dari nilai yang diperoleh koefisien korelasi dari persamaan tersebut mendekati angka 1 dan nilai koefisien variansi $\leq 2\%$ yang menandakan bahwa metode ini memberikan kelinieran yang baik, artinya dengan metode yang

digunakan ini, alat KCKT dapat memberikan respon yang sebanding terhadap konsentrasi asam retinoat.

Tabel V.1. Data Kurva Kalibrasi dan Linieritas

Konsentrasi (ppm)	Luas Area
10	19628677
20	38215643
30	59407603
40	78010424
50	98911848



Gambar V.1. Kurva Kalibrasi dan Linieritas

5.7.2. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Hasil uji batas deteksi dihitung berdasarkan kurva kalibrasi asam retinoat terhadap luas area kromatogram. Nilai batas deteksi alat terhadap asam retinoat yang diperoleh adalah 1,158 ppm dan batas kuantitasi 3,86 ppm.

5.7.3. Akurasi

Akurasi adalah suatu metode yang digunakan untuk mengetahui kedekatan hasil pengujian menggunakan metode analisis dengan hasil yang sebenarnya dengan melihat harga persen perolehan kembalinya (*% recovery*). Uji akurasi yang dilakukan adalah dengan metode standar adisi dengan menggunakan 2 buah

sampel pada 2 rentang konsentrasi. Sampel yang digunakan adalah sampel B dan K dengan ditambahkan baku standar masing-masing 5 dan 10 ppm. Persen perolehan kembali sampel B adalah 96,05-96,1% dan sampel K 104,78-134,4%, dimana persen perolehan kembali yang baik adalah antara 80-110%.

Tabel V.2. Hasil Pengukuran Akurasi

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Perolehan Kembali (%)	Rentang (%)
B	5	96,1 ± 0,43	96,05 - 96,1
	10	96,052 ± 0,732	
K	5	134,4 ± 1,125	104,78 - 134,4
	10	104,777 ± 0,362	

Keterangan:

Konsentrasi asam retinoat yang diperoleh merupakan hasil perhitungan dari persamaan kurva baku $y = 1990360,5x - 21319$, $R^2 = 0,999$

5.7.4. Presisi

Presisi adalah pengujian secara berulang pada salah satu konsentrasi dengan kondisi pengujian yang sama, biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (% SBR). Pengujian presisi ini dilakukan sama halnya dengan pengujian akurasi, yaitu digunakan 2 sampel (sampel B dan K) dengan metode standar adisi yang ditambahkan baku standar konsentrasi 10 ppm. Dari hasil uji presisi ini diperoleh 0,18% dari sampel B dan 0,11% dari sampel K. Dari keduanya memiliki nilai simpangan baku relatif $\leq 2\%$ yang artinya metode yang digunakan ini memiliki keterulangan yang baik.

Tabel V.3. Hasil Pengukuran Presisi

Sampel	Pengukuran	Luas Area	Kadar (x)	Sampel	Pengukuran	Luas Area	Kadar (x)	
B	1	9851203	4,960167769	K	1	11233137	5,654481186	
	2	9870702	4,969964486		2	11299375	5,687760584	
	3	9990858	5,03033345		3	11301972	5,689065373	
	4	9973110	5,021416472		4	11372785	5,72464335	
	5	10044139	5,057102972		5	11373569	5,725037248	
	6	10137938	5,104229611		6	11439114	5,757968469	
	Jumlah		30,14321476		Jumlah			34,23895621
	Rata-rata		5,023869127		Rata-rata			5,706492702
	SD		0,05398828		SD			0,036559274
	SBR (%)		0,179105914		SBR (%)			0,106776836

Keterangan:

Konsentrasi asam retinoat yang diperoleh merupakan hasil perhitungan dari persamaan kurva baku $y = 1990360,5x - 21319$, $R^2 = 0,999$

5.8. Analisis Sampel dengan KCKT

Setelah itu dilakukan pengujian sampel dengan KCKT pada 5 buah sampel (A, B, F, G, dan K) yang telah dipilih. Dari hasil pengujian, hanya sampel F yang tidak terdeteksi adanya asam retinoat, sedangkan sampel A, B, G, dan K terlihat puncak yang memiliki waktu retensi sama dengan baku standar asam retinoat, yaitu $\pm 9,5$ menit dengan konsentrasi asam retinoat terukur sangat kecil.

Tabel V.4. Konsentrasi Sampel

Sampel	Luas Area	Konsentrasi (ppm)
A	488306	0,585701413
B	87380	0,38358217
F	-	-
G	52107	0,365799956
K	985893	0,836550467

Keterangan:

Konsentrasi asam retinoat yang diperoleh merupakan hasil perhitungan dari persamaan kurva kalibrasi $y = 1983611,23x - 673497,9$, $R^2 = 0,999$

Dengan melihat konsentrasi asam retinoat yang terdeteksi dari sampel A, B, G, dan K sangat jauh dari konsentrasi batas deteksi alat, dapat disimpulkan bahwa krim yang diuji tidak mengandung asam retinoat. KCKT mampu

menganalisis asam retinoat secara kualitatif, namun kadar terukur tidak terkuantifikasi. Sangat rendahnya kadar asam retinoat yang terukur ini disebabkan karena banyaknya paparan sinar cahaya selama proses ekstraksi dan analisis yang tidak dapat dibatasi.

