# BAB III METODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif yang dilakukan di laboratorium Farmasi Terpadu UMN Al-Washliyah dengan tujuan Untuk mengetahui ada tidaknya kandungan Rhodamin B dan untuk menentukan kadar Rhodamin B pada bumbu tabur. Rancangan penelitian ini meliputi cara pengumpulan dan pembuatan larutan sampel, pembuatan larutan standar Rhodamin B, pengujian ada tidaknya kandungan Rhodamin B dan penetapakan kadar Rhodamin B dengan metode Kromatografi Cair kinerja Tinggi.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel Bumbu Tabur yang dijual dipasar yang ada di Kota Medan, Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan Rhodamin B dan kadar Rhodamin B secara kromatografi cair kinerja tinggi.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter penelitian ini menggunakan uji laboratorium secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi meliputi cara preparasi sampel, pengujian kandungan Rhodamin B, pembuatan kurva kalibrasi Rhodamin B dan penetapan kadar Rhodamin B.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Mei 2024 di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

### Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al- Washliyah Medan.

## 3.3 Bahan Dan Peralatan

### 3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah standart Rhodamin B (Merck), sampel Bumbu Tabur yang terjual di pasaran, Amoniak pro Analisis (Merck), Metanol pro analisis (Sigma-Aldrick) Etil Asetat pro analisis (J.T. baker), Aquades, Acetonitril pro analisis(Merck), Butan-1-ol pro analisis (Merck).

### 3.3.2 Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan adalah HPLC (Rigol), perangkat komputer, software Imagej, timbangan analitik, corong (pyrex), labu ukur (Iwaki Pyrex), pipet tetes, bola hisap, pipet ukur (Iwaki Pyrex), beaker glass (Iwaki Pyrex), batang pengaduk, bejana camag, spatula, lempeng KLT Silika Gel GF254, kertas saring (Whatman)

## 3.4 Persiapan sampel

Sampel yang digunakan yaitu bumbu tabur yang terdaftar dan tidak terdaftar BPOM yang terjual di pasaran, Sampel A,B,C,D,E,F,G.

## 3.5 Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Analisis Kualitatif Kromatografi Lapis Tipis

**Pembuatan Larutan Sampel**

Timbang 1 gram bumbu Tabur menggunakan timbangan analitik, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan sampai tanda batas menggunakan metanol pro analisis (Febrianti & Hakim, 2018).

**Pembuatan Baku Pembanding Rhodamin B**

Timbang 50 mg pewarna Rhodamin B menggunakan timbangan analitik, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml dan ditambahkan sampai tanda batas menggunakan metanol pro analisis (Rahman et al., 2023)

**Pembuata Fase Gerak (Eluen)**

Masukkan dalam bejana Kromatografi berupa etil asetat : n-butanol: amonia 25% dengan perbandingan (20:55:25). Dibiarkan eluen sampai jenuh dengan cara dicelupkan kertas saring pada fase gerak. Bejana ditutup rapat, lalu fase gerak dibiarkan menguap atau naik hingga membasahi kertas saring (Rahman et al., 2023)

**Identifikasi analisis kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis**

Tahap identifikasi sampel dengan metode KLT yaitu menggunakan silika gel GF254 yang berukuran 20 cm x 20 cm. Kemudian sampel bumbu tabur dan Rhodamin B ditotolkan menggunakan pipa kaliper di plat KLT dengan jarak pada jarak 1 cm dari bagian bawah plat. Kemudian masukkan ke dalam chamber yang berisi fase gerak etil asetat : N-butanol : ammonia 25% dengan perbandingan (20:55:25) v/v/v. Setelah eluen sampai tanda batas, angkat dan keringkan. Kemudian diamati menggunakan sinar UV 254 nm. Apabila secara visual noda berwarna merah muda dan di bawah sinar UV kuning atau orange, hal ini menunjukkan adanya Rhodamin B, maka hitung harga Rf (Rahman et al., 2023).

### 3.5.2 Analisis Kuantitatif Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

**Pembuatan Fase Gerak**

Buat campuran pelarut asetonitril – metanol – air dengan perbandingan (47:47:6), homogenkan dengan ultrasonic vibrator selama 15 menit. Larutan kemudian disaring dengan milipore 0,45 µm. Injeksikan ke dalam sistem kckt dengan panjang gelombang 554 nm, laju alir 1 ml/menit, volume injeksi 20 µl (tentukan waktu retensi, tailing factor, fronting) (Rachmawati et al., 2022).

**Pembuatan Larutan Standart Rhodamin B**

Timbang seksama Rhodamin B sebanyak 50 mg, masukkan ke dalam labu ukur 50 ml, larutkan dengan metanol pro analisis sampai tanda batas kemudian homogenkan (1000 ppm) (LIB 1) (Komarudin et al., 2019).

**Pembuatan Larutan Standart Rhodamin B**

Dipipet sebanyak 5 ml larutan standar 1000 ppm masukkan kedalam labu ukur 50 ml, larutkan dengan metanol pro analisis sampai tanda batas kemudian homogenkan (100 ppm) (LIB II) (Komarudin et al., 2019).

**Pembuatan Larutan Uji**

Larutan uji dibuat dengan melarutkan larutan standar (LIB II) sebanyak 0,6 ml kedalam labu ukur 10 ml tambahkan metanol pro analisis sampai tanda batas, kocok sampai homogen. Larutan kemudian di saring dengan milipore 0,45 µm. Injeksikan ke dalam sistem KCKT dengan panjang gelombang 554 nm, laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 20 µL. Tentukan waktu retensi yang diperoleh (Rachmawati et al., 2022).

**Pembuatan Kurva Kalibrasi**

Buat larutan kurva kalibrasi dari larutan standart (100 ppm) dengan membuat 6 konsentrasi yaitu konsentrasi larutan 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 pmm, 10 ppm, 12 ppm, masing – masing di masukkan ke dalam labu ukur 10 ml tambahkan dengan metanol pro analisis sampai tanda batas, kocok sampai homogen. Larutan kemudian di saring dengan milipore 0,45 µm. Injeksikan kedalam sistem KCKT dengan panjang gelombang 554 nm, laju alir 1 ml/menit, volume injeksi 20 µl (Rachmawati et al, 2022).

**Pembuatan larutan sampel**

Sampel bumbu tabur di timbang sebanyak 1 g menggunakan timbangan analitik, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, ditambahkan metanol pro analisis sampai tanda batas dan di homogenkan. Larutan kemudian di saring dengan milipore 0,45 µm. Injeksikan kedalam sistem KCKT dengan panjang gelpombang 554 nm, laju alir 1 ml/ menit, volume injeksi 20 µm (Komarudin et al., 2019).