BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian Kosmetik

Menurut Wasitaatmadja (2011), kosmetik berasal dari bahasa yunani "*kosmein*" yang artinya berhias. Pada zaman dahulu pembuatan kosmetik banyak memakai dari bahan-bahan alami dari tanaman. Tetapi sekarang dengan seiring berkembangnya zaman kosmetik tidak hanya dibuat dari bahan alami tetapi dengan bahan kimia.

Kosmetik yaitu salah satu keperluan yang dianggap penting bagi sebagian masyarakat. Pada dasarnya kosmetik adalah sediaan yang berupa campuran dari bahan-bahan yang digunakan pada anggota tubuh bagian luar yang tujuannya untuk melindungi, memperbaiki, mempercantik diri dan merawat diri dalam kondisi baik.

2.1.1 Penggolongan Kosmetik

Berdasarkan jenis bahan dasar dan proses cara pengolahannya kosmetik terbagi menjadi dua yaitu (Tranggono, 2012):

a. Kosmetik tradisional

   Kosmetik tradisional merupakan kosmetik yang berasal dari bahan alami yang segar atau yang telah dibuat simplisia bisa dari buah-buahan atau tanam-tanaman. Kosmetik jenis ini dapat dibuat sendiri di rumah dan merupakan tradisi yang diwariskan turun-temurun, leluhur atau nenek moyang sejak dulu

b. Kosmetik modern

   Kosmetik modern yaitu kosmetik yang dibuat secara modern, yang telah dicampur dengan berbagai macam zat kimia, misalnya seperti bahan pengawet untuk kosmetik agar tahan lama sehingga tidak cepat rusak, bahan pewarna kosmetik agar produk terlihat lebih menarik.

Penggolongan kosmetik terbagi dua berdasarkan kegunaannya bagi kulit (Tranggono, 2007):

a. Kosmetik untuk perawatan
   1) Pembersih kulit (*cleanser*): sabun, *cleansing cream*, dan *cleansing milk*.
   2) Pelembab kulit (*moisturizer*): *moisturizer cream*, *night cream*.
   3) Pelindung kulit, misalnya *sunscreen cream*, *sunscreen foundation*.
   4) Penipis atau untuk mengelupas kulit (*peeling*), misalnya *scrub cream* yang berisi butiran halus.

b. Kosmetik dekoratif

   Kosmetik jenis ini digunakan bertujuan untuk merias atau menutup kekurangan pada kulit sehingga dapat menghasilkan tampilan yang lebih menarik dan menambah kepercayaan diri seperti *make-up*. Kosmetik dekoratif terbagi dua, yaitu:
   1) Memiliki efek pada permukaan dan bersifat sementara misalnya bedak, *liptint*, *blush on, eyeshadow* dan lain-lain.
   2) Memiliki efek mendalam dan bersifat tahan lama seperti pemutih kulit, cat rambut, dan pengeriting rambut.

Penggolongan kosmetik berdasarkan surat edaran BPOM No.HK.07.4.42.01.16.84 Tahun 2016:

a. Sediaan bayi, seperti *baby oil*, *baby lotion*, *baby cream*, dan sediaan bayi lainnya
b. Sediaan perawatan kulit, seperti masker, masker mata
c. Sediaan rias wajah, seperti dasar *make-up*, alas bedak
d. Sediaan mandi, seperti sabun mandi dan sabun mandi antiseptik
e. Sediaan wangi-wangian, seperti pewangi badan, parfum
f. Sediaan perawatan kulit, seperti lulur dan mangir
g. Sediaan rambut, seperti *depilatory*
h. Sediaan kebersihan badan, seperti penyegar kulit, krim malam, krim siang, dan pelembab
i. Sediaan cukur, seperti sediaan cukur dan sediaan pasca cukur

j. Sediaan rias mata, seperti pensil alis, *eye liner,* maskara, dan sediaan rias mata lainnya
k. Sediaan *hygiene* mulut, seperti pasta gigi, dan penyegar mulut
l. Sediaan kuku, seperti pewarna kuku
m. Sediaan tabir surya, seperti *suncscreen*
n. Sediaan menggelapkan kulit, seperti sediaan untuk menggelapkan kulit tanpa berjemur.

2.1.2 Persyaratan kosmetik

Menurut Tranggono & Ratna (2014), produsen menyerahkan terlebih dahulu kepada pemerintah cara pemakaian produk yang ingin diedarkan ke masyarakat untuk dijual, disertai dengan laporan pengujian keamanan kosmetik tersebut secara praklinik dan klinik. Kosmetik yang dinyatakan berbahaya oleh pemerintah untuk masyarakat maka dilarang untuk diedarkan.

Berikut persyaratan kosmetik yang ingin diproduksi dan diedarkan:

a. Bahan yang digunakan telah memenuhi standar dan persyaratan mutu serta persyaratan lain yang telah ditetapkan
b. Diproduksi menggunakan cara pembuatan kosmetik yang baik
c. Telah terdaftar dan mendapat izin edar dari Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM, 2015).

2.2 Liptint

Liptint adalah suatu produk kosmetik pewarna bibir yang dapat memberikan efek warna pada bibir. Tekstur *Liptint* bervariasi, ada yang cair dan gel, tetapi bukan lilin. Warnanya bisa terlihat tipis maupun pekat tergantung dengan cara mengaplikasikannya pada bibir. *Liptint* biasanya digunakan setelah memakai *lipbalm*. *Liptint* yang baik adalah *Liptint* yang dapat mempercantik warna bibir dan mempu memberikan nutrisi dan dapat melembabkan bibir (Asmawati, *et al.,* 2019).

Produk *Liptint* terbagi beberapa jenis yaitu:

a. Basis air

Liptint jenis ini memiliki tekstur yang lembut seperti air dan memiliki tingkat pewarnaan yang tinggi, serta dapat memberikan hasil akhir yang tidak mengkilap. *Liptint* jenis ini cocok untuk yang suka membuat gradasi bibir dan senang dengan warna-warna yang kuat.

b. *Gloss Liptint*

Liptint ini mampu menghasilkan hasil yang mengkilap dan bibir terlihat lebih tebal. Jika dibandingkan dengan *lipgloss* biasa, warna pada bibir tidak akan mudah hilang karena adanya sejenis tinta di dalam *Liptint* ini. Tapi jika kita bandingkan dengan *Liptint* pada umumnya, jenis ini memiliki kadar warna yang lebih rendah.

c. Basis minyak

Liptint ini berbasis minyak, sehingga memberikan efek *glossy* dan meningkatkan kelembaban bibir. Secara tekstur, *Liptint* jenis ini memberikan warna yang lebih natural dibandingkan dengan *Liptint* basis air.

d. *Pack Liptint*

Liptint ini sedikit berbeda dengan *make-up* bibir pada umumnya. Cara menggunakannya yaitu seperti masker *peel off*. Setelah diaplikasikan, tunggu selama 10 menit agar bisa dengan mudah mengelupas lapisan tersebut. *Liptint* jenis ini sulit untuk dibersihkan, disarankan untuk menggunakan *lip remover* untuk membersihkan dengan sempurna.

2.3 Zat Pewarna

Zat pewarna adalah bahan tambahan yang biasanya digunakan pada kosmetik dekoratif. Peran zat pewarna pada kosmetik dekoratif sangat penting karena dapat memberikan warna yang menarik. Menurut Iswari (2007), zat pewarna untuk kosmetik dekoratif terbagi menjadi dua yaitu:

2.3.1 Pewarna alami

Pewarna alami dibuat dari bahan alam dengan berbagai macam proses yaitu ekstraksi, isolasi, atau sintesis parsial misalnya dari buah-buahan atau tanaman. Pada zaman sekarang ini pewarna alami jarang digunakan pada kosmetik, padahal keamanannya terhadap kulit lebih baik daripada pewarna sintesis, tetapi pewarna alami ini mempunyai kelemahan yaitu kekuatan warnanya relatif lemah, tidak tahan cahaya dan relatif mahal dibandingkan pewarna sintesis. Misalnya senyawa kimia *carmine* zat warna merah yang diperoleh dari tubuh serangga *coccus cacti* yang dikeringkan, klorofil daun-daun hijau, henna yang diekstraksi dari daun *Lawsonia inermis*.

2.3.2 Pewarna sintesis

Pewarna sintesis merupakan pewarna yang diperoleh secara kimiawi. Zat pewarna sintetis pertama kali disintetis dari anilin, setelah itu benzena, toluena, *anthracene* yang berfungsi sebagai produk awal bagi kebanyakan zat warna.

Pewarna sintesis dibuat dengan proses penambahan asam sulfat atau asam nitrat yang dapat terkontaminasi oleh senyawa arsen atau logam berat lain yang memiliki sifat beracun. Pembuatan zat pewarna organik harus melalui senyawa yang cukup berbahaya dan senyawa tersebut sering tertinggal dalam produk akhir atau terbentuk senyawa-senyawa baru yang berbahaya.

Perlu diperhatikan sifat-sifat zat pewarna sintetis diantaranya yaitu:

a. Intensitas yang kuat sehingga jumlah sedikit pun sudah dapat menghasilkan warna
b. Mempunyai sifat larut dalam air, alkohol, minyak. Yang larut air hampir selalu juga larut dalam alkohol encer, gliserol, dan glikol. Yang larut minyak juga larut dalam benzena, karbon tetraklorida, dan pelarut organik lainnya, terkadang juga dalam alkohol tinggi. Tidak pernah ada zat warna yang sekaligus larut dalam air dan minyak

c. Sifat yang berhubungan dengan pH. Beberapa zat warna hanya larut dalam pH asam, lainnya hanya dalam pH alkalis. Beberapa jenis hanya memberi warna yang diinginkan dalam pH tertentu, atau tidak stabil dalam pH tertentu
d. Kelekatan pada kulit atau rambut. Daya lekat zat pewarna terhadap kulit dan rambut berbeda-beda, terkadang memerlukan daya lekat besar seperti cat rambut, namun terkadang menghindarinya misalnya untuk pemerah pipi
e. Toksisitas harus dihindari.

Penggunaan zat pewarna sintesis dapat menimbulkan efek negatif terhadap kesehatan manusia jika (Nugraheni, 2014):

a. Bahan sintesis yang dikonsumsi dalam jumlah sedikit tetapi berulang-ulang
b. Bahan sintesis yang dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama
c. Masyarakat yang luas dengan daya tahan yang beraneka ragam tergantung pada umur, jenis kelamin, serta berat badan
d. Penyimpanan bahan pewarna sintesis oleh pedagang bahan kimia yang tidak memenuhi persyaratan.

Peraturan mengenai penggunaan zat pewarna di Indonesia yang diizinkan dan dilarang diatur melalui SK Menteri Kesehatan RI Nomor 722/Menkes/Per/IX/88 (Cahyadi, 2006).

Tabel 2.1 Bahan pewarna sintesis yang diizinkan di Indonesia

No	Pewarna		Nomor Indeks Warna (C.I.No)	Batas Maksimum Penggunaan
1	Amaran	Amaranth: Cl Food Red 9	16185	Secukupnya
2	Biru berlian	Brilliant blue FCF: Cl Food Red 2	42090	Secukupnya
3	Eritrosin	Erithrosin: Cl Food Red 14	45430	Secukupnya
4	Hijau FCF	Fast Green FCF: Cl Food Green 3	42053	Secukupnya
5	Hijau S	Green S: Cl Food Green 4	44090	Secukupnya
6	Indigotin	Indigotin: Cl Food Blue I	73015	Secukupnya
7	Ponceau 4R	Ponceau 4R: Cl Food Red 7	16255	Secukupnya
8	Kuning Kuinelin	Quineline yellow: Cl Food yellow 3	74005	Secukupnya
9	Kuning FCF	Sunset yellow FCF: Cl Food yellow 3	15980	Secukupnya
10	Riboflavina	Riboflavina	-	Secukupnya
11	Tartrazine	Tartrazine	19140	Secukupnya

(Cahyadi, 2006)

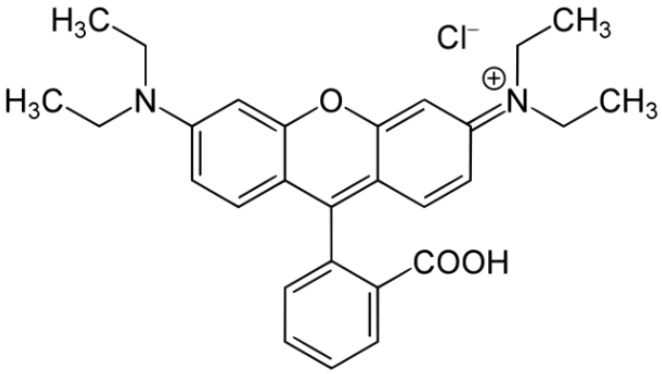
Tabel 2.2 Bahan pewarna sintesis yang dilarang di Indonesia

No	Bahan pewarna		Nomor Indeks Warna (C.I.No)
1	Citrus red No.2	-	12156
2	Ponceau 3R	(Red G)	16155
3	Ponceau SX	(Food Red No.1)	14700
4	Rhodamin B	(Food Red No.5)	45170
5	Guinea Green B	(Acid Green No.3)	42085
6	Magenta	(Basic Violet No.14)	42510
7	Chrysoidine	(Basic Orange No.2)	11270
8	Butter yellow	(Solvent Yellow No.2)	11020
9	Sudan I	(Food Yellow No.2)	12055
10	Methanil Yellow	(Food Yellod No.14)	13065
11	Ayramine	(Ext. D & C Yellow No.1)	41000
12	Oil Oranges SS	(Basic Yellow No.2)	12100
13	Oil Orange XO	(Solvent Oranges No.7)	12140
14	Oil Yellow AB	(Solvent Oranges No.5)	11380
15	Oil Yellow OB	(Solvent Oranges No.6)	11390

(Cahyadi, 2006)

2.4 Rhodamin B

2.4.1 Pengertian Rhodamin B



Gambar 2.1 Struktur Kimia Rhodamin B
Sumber: (Depkes RI,2014)

Rumus kimia	:$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$
Berat molekul	:479
Nama kimia	:Tetraetil Rhodamin; D&C Basic Violet 10; C.l.45170
Pemerian	:Hablur berwarna hijau atau serbuk ungu kemerahan

Gambar 2.2 Serbuk Rhodamin B

Kelarutan :Sangat mudah larut dalam air; menghasilkan larutan merah kebiruan dan berfluoresensi kuat jika diencerkan. Sangat mudah larut dalam etanol, sukar larut dalam asam encer dan dalam larutan alkali. Larut dalam asam kuat, membentuk senyawa dengan kompleks *antimony* berwarna merah muda yang larut dalam isopropil eter (Depkes RI, 2014).

Rumus molekul dari Rhodamin B adalah C1NC1 dengan berat molekul sebesar 479.000. Rhodamin B berbentuk kristal hijau atau serbuk ungu kemerahan-merahan, sangat larut dalam air dan akan menghasilkan warna merah kebiru-biruan dan berfluoresensi kuat. (Cahyadi, 2008).

Menurut Hayat, *et al* (2015), Rhodamin B merupakan zat aktif yang berbahaya yang dapat menimbulkan berbagai efek negatif terhadap kulit dan bagi kesehatan dalam jangka panjang. Efek negatif yang ditimbulkan seperti iritasi ringan, berat hingga sedang.

Rhodamin B pada biasanya digunakan sebagai zat pewarna untuk tekstil, kertas dan sebagai reagensia untuk pengujian beberapa senyawa kimia. Rhodamin B dilarang penggunaannya dalam obat, makanan dan kosmetik (Permenkes No.239/Menkes/Per/V/85 tentang zat warna tertentu yang ditanyakan sebagai bahan berbahaya), Rhodamin B seringkali disalahgunakan untuk pewarna pangan dan kosmetik misalnya sirup, krupuk, lipstick, dan lain- lain.

2.4.2 Bahaya penggunaan Rhodamin B pada kesehatan

Rhodamin B memiliki toksisitas yang rendah, jika mengkonsumsi dalam jumlah yang besar maupun berulang dapat mengakibatkan efek negatif bagi kesehatan tubuh, diantaranya:

a. Jika terhirup, mengenai kulit, mengenai mata dan tertelan. Efek negatiff yang dapat terjadi iritasi pada saluran pernapasan, kulit, mata, dan saluran pencernaan
b. Dapat menyebabkan gangguan fungsi hati dan kanker hati

c. Bila mengkonsumsi makanan yang mengandung Rhodamin B dalam tubuh akan terjadi penumpukan lemak, sehingga lambat laun jumlahnya terus bertambah. Dampaknya akan kelihatan setelah puluhan tahun kemudian
d. Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa dari penggunaan zat pewarna ini pada makanan dapat menyebabkan kerusakan pada organ hati (Djarismawati, 2004).

Menurut Afriyeni & Utari (2018), Rhodamin B dapat mengiritasi saluran pernapasan dan bersifat karsinogenik atau memacu pertumbuhan sel kanker jika digunakan terus menerus. Rhodamin B dapat menimbulkan penumpukan dalam hepar yang menyebabkan gangguan fungsi hepar yaitu berupa kanker hati dan tumor hati.

Efek samping yang berbahaya akibat mengonsumsi makanan yang mengandung zat pewarna tambahan yang berbahaya seperti zat pewarna sintesis tidak dapat secara langsung. Efek samping akan terasa dalam waktu lama yaitu setelah 10 atau 20 tahun. Berdasarkan penelitian terdahulu telah dibuktikan bahwa zat pewarna sintetis bersifat racun bagi manusia sehingga bisa membahayakan kesehatan (Cahyadi, 2006).

Rhodamin B memiliki efek akut dan kronis. Pada efek akut, paparan menyebabkan kerusakan parah pada mata, kontak dengan kulit akan menyebabkan iritasi (kontak dengan aerosol Rhodamin B dalam 26 menit menyebabkan efek iritasi yang selesai dalam 24 jam), dan bila masuk pembuluh darah melalui lesi, abrasi, atau luka akan menyebabkan kerusakan sistemik. Pada efek kronis, tampak sifat-sifat karsinogenik.

Menurut Yulianti (2007), Mata yang terkena zat pewarna Rhodamin B akan mengalami iritasi ditandai dengan mata kemerahan dan timbunan cairan atau udem pada mata. Jika terkena bibir dapat menyebabkan bibir pecah-pecah, kering, gatal, bahkan kulit bibir terkelupas.

2.5 Analisis Rhodamin B

2.5.1 Analisis Kualitatif

2.5.1.1 Warna

Dalam analisis kualitatif uji warna dilakukan untuk menguji senyawa menggunakan pereaksi dengan mengamati warna yang dihasilkan atau perubahan warna yang terjadi. Prosedur ini digunakan terhadap senyawa anorganik seperti kation, anion, ataupun juga untuk senyawa organik seperti teknik skrining fitokimia dalam pemilihan metabolit sekunder tumbuhan.

Kelebihan dan kekurangan uji warna yaitu:

a. Kelebihan :
   1) Bersifat sederhana, mudah dan cepat
   2) Mudah diinterpretasikan
   3) Warna terbentuk dengan cepat dan mudah diamati
   4) Sensitifitasnya cukup tinggi
   5) Murah
   6) Tidak memerlukan alat yang mahal & keahlian yang tinggi.

b. Kekurangan :

   Warnanya dapat ditutupi oleh ketidakmurnian atau adanya senyawa lain.

2.5.1.2 Nyala

Uji nyala merupakan prosedur analisis kualitatif yang biasanya digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan ion logam dalam jumlah yang relatif kecil pada sebuah senyawa. Tetapi tidak semua ion logam dapat menghasilkan warna nyala.

Uji nyala merupakan cara yang paling mudah untuk mengidentifikasi logam alkali dan alkali tanah, Untuk logam-logam lainnya ada metode mudah yang lebih dapat dipercaya dibandingkan uji nyala ini.

Adapun kelebihan dan kekurangan uji nyala yaitu:

a. Kelebihan
    1) Cepat
    2) Mudah
    3) Biayanya murah
b. Kekurangan
    1) Memiliki kesulitan dalam mendeteksi beberapa unsur dalam jumlah kecil
    2) Jika terlalu besar juga cenderung memudarkan warna nyala hingga tidak muncul sama sekali.

2.5.1.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Pengertian KLT

Kromatografi yaitu suatu metode pemisahan secara fisika yang mana komponen-komponen yang akan dipisahkan terbagi menjadi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak yang bergerak ke arah tertentu. Kromatografi memiliki tiga fungsi yaitu bisa digunakan untuk analisis kualitatif, kuantitatif, dan preparatif (Gandjar & Rohman, 2013).

KLT yaitu bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. KLT merupakan metode pemisahan campuran analit dengan mengelusi analit melalui suatu lempeng kromatografi lalu melihat komponen/ analit yang terpisah dengan pengecatan (Gandjar & Rohman, 2013).

Menurut Marjoni (2016), pada KLT fase diam yang digunakan adalah zat padat yang disebut adsorben (penyerap) dan fase gerak adalah zat cair yang disebut dengan larutan pengembang.

1) Fase Diam

Fase diam yaitu berupa lapisan tipis yang terdiri dari bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar dengan bantuan bahan pengikat. Fase diam harus

mengandung air sekecil mungkin, karena air akan menempati semua titik penyerapan sehingga tidak akan ada senyawa yang melekat. Sebelum digunakan plat KLT sebaiknya diaktifkan terlebih dahulu dengan cara pemanasan pada suhu 110^{o}C selama 30 menit (Marjoni, 2016).

Hal terpenting dari fase diam adalah memiliki ukuran partikel yang kecil dengan ukuran antara 10-30 μm. Semakin kecil ukuran partikel fase diam, maka akan semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya. Lempeng KLT terbuat dari kaca, gelas, atau aluminium dengan ketebalan 250 μm (Gandjar & Rohman, 2013).

Tabel 2.3 Beberapa fase diam yang digunakan pada KLT

No	Fase diam	Mekanisme absorpsi	penggunaan
1	Silika gel	Adsorpsi	Asam amino, hidrokarbon, vitamin, alkaloid
2	Silika yang dimodifikasi dengan hidrokarbon	Partisi termodifikasi	Senyawa-senyawa non polar
3	Serbuk selulosa	Partisi	Asam amino, nukleotida, karbohidrat
4	Alumina	Adsorpsi	Hidrokarbon, ion logam, pewarna makanan, alkaloid
5	Kieselguhr (tanah diatomae)	Partisi	Gula, asam-asam lemak
6	Selulosa penukar ion	Pertukaran ion	Asam nukleat, nukleotida, halide, dan ion-ion logam
7	Gel sephadex	Eksklusi	Polimer, protein, kompleks logam
8	B-siklodekstrin	Interaksi adsorpsi stereospesifik	Campuran enansiomer

(Gandjar & Rohman, 2007)

2) Fase gerak

Fase gerak terdiri dari satu atau beberapa pelarut dan bila diperlukan dapat menggunakan sistem pelarut campur. Untuk memisahkan senyawa-senyawa organik dan dapat menghasilkan pemisahan senyawa menjadi lebih baik biasanya digunakan pelarut campuran untuk memperoleh sistem pengembang yang cocok (Marjoni, 2016).

Pemilihan fase gerak sering dilakukan dengan mencoba yang didasarkan pada polaritas dari sampel yang diujikan. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat berlangsung secara optimal (Gandjar & Rohman, 2013).

Tabel 2.4 Campuran pelarut yang digunakan dalam KLT untuk berbagai pemisahan yang representatif

Fase diam	Proses adsorpsi yang dominan	Senyawa yang dipisahkan	Sistem pelarut	Metode deteksi	Keterangan
Silika	Adsorpsi	Asam amino	Butanol-asam Asetat-air (1:1) Fenol-air (3:1)	Ninhydrin atau densitometer	Pengembangan 2 dimensi
		Asam lemak	Dipropil eter-heksana (1:1)	Indicator pH atau asam sulfat 50%	Pengembangan 2 dimensi, penjapar dilengkapi dengan pengikat dan AgNO3
		Asam-asam lemak tidak jenuh	Petroleum eter-dietil eter	Iodium atau difenilkarbazol	-
		Lemak-lemak	Kloroform-metanol-air (65:25:4)	Iodium atau asam sulfat 50%	Sesuai untuk fosfolipid dan lipid-lipid netral
		Minyak hidrokarbon	Kloroform-benzena	Fluoresensi atau asam sulfat pekat	-
		Sterol	Kloroform-aseton (95:5)	Asam sulfat 50%	Penjerap dilengkapi dengan pengikat dan AgNO3
		Gula-gula	Etil asetat-asam asetat-metanol-air (60:15:15:10)	α-naftol-asam sulfat	-
Alumina	Adsorpsi	Asam-asam amino	Butenol-etanol-air	Ninhidrin	-
		Vitamin	Heksan-aseton	Antimon klorida dalam asam asetat	Penjerap dilengkapi dengan pengikat dan AgNO3
		Gula-gula	Propanol-air-kloroform (6:2:1)	α-naftol-asam sulfat	-
Keisilgehr	Adsorpsi atau partisi	Disakarida	Propanol-etil asetat (65:35)	α-naftol-asam sulfath	-

		Karotenoid	Propanol-petroleum eter-dietil eter	Visual	-
Fase diam	**Proses adsorpsi yang dominan**	**Senyawa yang dipisahkan**	**Sistem pelarut**	**Metode deteksi**	**keterangan**
Selulosa	Partisi	Asam amino	Butanol-asam asetat-air (60:15:25)	Ninhidran	-
		Karbohidrat	Butanol-piridin-air (6:4:3)	ρ-anisidin flalat	-

(Gandjar & Rohman, 2013)

b. Nilai *Retardation factor* (*Rf*)

Pada metode KLT dan juga kromatografi kertas, hasil yang didapatkan digambarkan dengan mencantumkan nilai *Rf* -nya yang merujuk pada migrasi relatif analit terhadap ujung depan fase gerak atau eluen, menilai ini terkait dengan koefisien distribusi komponen. Nilai *Rf* didefinisikan sebagai:

$$Rf = \frac{Jarak\ yang\ ditempuh\ solute}{Jarak\ yang\ ditempuh\ fase\ gerak}$$

Nilai *Rf* ini terkait dengan faktor perlambatan. Nilai *Rf* bukanlah suatu nilai fisika absolut untuk suatu komponen, meskipun demikian, dengan pengendalian kondisi KLT secara hati-hati, nilai *Rf* dapat digunakan sebagai cara untuk identifikasi kualitatif (Gandjar & Rohman, 2012).

c. Tujuan penggunaan KLT antara lain:
   1) Untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, atau preparatif
   2) Untuk mencari sistem pelarut yang akan dipakai dalam kromatografi kolom (Marjoni, 2016)

d. Prinsip KLT

KLT merupakan metode pemisahan komponen kimia berdasarkan adsorbsi dan partisi, yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen kimia akan naik mengikuti fase gerak akibat daya adsorpsi dari fase diam. Kemampuan menyerap dari fase diam terhadap masing-masing komponen kimia berbeda-beda tergantung tingkat kepolarannya, sehingga dengan adanya perbedaan daya serap ini, akan terjadi pemisahan dari masing-masing komponen. KLT menggunakan sebuah silika lapis tipis atau alumina yang ditempatkan pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Silika gel atau alumina ini berfungsi sebagai fase diam dan sering juga ditambahkan bahan-bahan

yang dapat berpendar pada sinar ultra violet. Fase gerak untuk KLT berupa pelarut atau campuran pelarut yang sesuai dengan bahan yang dipisahkan (Marjoni, 2016)

e. Persyaratan dalam penggunaan KLT
   1) Senyawa yang digunakan mempunyai tingkat penguapan yang rendah
   2) Senyawa bersifat polar, semi polar, non polar, atau ionik
   3) Sampel dalam jumlah banyak harus dilakukan analisis secara simultan
   4) Pada Kromatografi Cair dan Kromatografi Gas sampel yang akan dianalisis dapat merusak kolom
   5) Pelarut yang digunakan akan mengganggu penjerap dalam kolom Kromatografi Cair
   6) Komponen dari suatu campuran dari suatu senyawa akan dideteksi terpisah setelah pemisahan atau akan dideteksi dengan berbagai metode secara bergantian
   7) Tidak ada sumber listrik (Marjoni, 2016).

f. Keuntungan KLT

   Menurut Gandjar & Rohman (2012), beberapa keuntungan KLT adalah:
   1) Metode KLT pada umumnya digunakan untuk tujuan analisis
   2) Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar UV
   3) Dapat dilakukan elusi secara menaik (*ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi 2 dimensi
   4) Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak

g. Kekurangan KLT
    1) Perlu ketelitian dan kesabaran untuk mendapatkan bercak noda yang diharapkan
    2) Perlu banyak mencoba berbagai eluen atau fase gerak untuk menentukan sistem eluen yang cocok
    3) Tidak dapat menentukan kadar dari zat yang diidentifikasi.

2.5.2 Validasi Metode

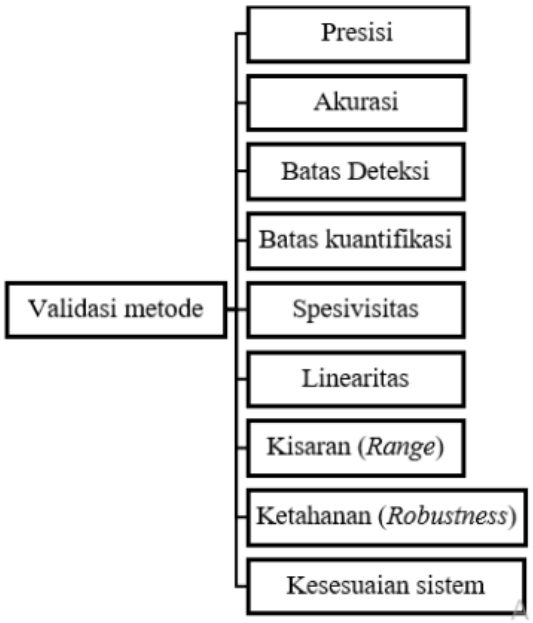
Validasi merupakan proses dimana suatu prosedur dievaluasi yang bertujuan untuk menentukan kemanjuan dan keandalan suatu metode untuk analisis, serta menunjukkan bahwa metode tersebut layak digunakan untuk tujuan yang dimaksudkan (Riyanto, 2014).

Menurut Riyanto (2014) diantara sebab metode uji perlu divalidasi, yaitu:

a. Jika suatu metode baru dikembangkan untuk masalah tertentu.
b. Jika metode rutin direvisi untuk pengembangan atau diperluas untuk memecahkan masalah analisis baru.
c. Jika hasil QC menunjukkan bahwa metode rutin tersebut berubah dari waktu ke waktu.
d. Jika metode rutin digunakan di laboratorium yang berbeda, atau dilakukan oleh analis berbeda, atau dilakukan dengan menggunakan alat yang berbeda.

2.5.2.1 Parameter validasi metode

Menurut ICH, dalam validasi metode uji ada beberapa parameter yang harus ditentukan, yaitu (Rohman, 2014):



Gambar 2.3 Parameter uji validasi metode menurut ICH
Sumber: (Rohman, 2014)

a. Ketelitian (Akurasi)

Akurasi merupakan suatu ukuran yang dapat menunjukkan tingkat kedekatan hasil analisis dengan kandungan analit sebenarnya yang terkandung dalam larutan atau sampel. Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*%recovery*) analit yang ditambahkan.

Penentuan akurasi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode adisi atau penambahan baku standar (*standard addition method*).

Pada metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam plasebo, kemudian campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar sebenarnya dari standar yang ditambahkan. *%Recovery* dapat ditentukan dengan membuat sampel plasebo (eksipien obat, cairan biologis) kemudian ditambahkan analit dengan konsentrasi tertentu, selanjutnya dianalisis dengan metode yang akan di

validasi. Jika tidak memungkinkan untuk membuat sampel plasebo, metode adisi dapat digunakan.

Pada metode adisi, sampel dianalisis, kemudian sejumlah analit yang akan diperiksa (pure analit/standar) ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan kemudian dianalisis kembali. Selisih antara kedua hasil tersebut dibandingkan dengan kadar sebenarnya (hasil yang diharapkan). Nilai perolehan kembali dapat dihitung menggunakan rumus berikut (Riyanto, 2014):

$$\%\ Recovery\ \frac{Cf - Cu}{Ca} x100\%$$

Keterangan:

Cf = Konsentrasi analit dengan penambahan standar

Cu = Konsentrasi analit tanpa penambahan standar

Ca = Konsentrasi analit standar yang ditambahkan

Tabel 2.5 Nilai %recovery berdasarkan nilai konsentrasi sampel

Analit pada matriks sampel	*Recovery* yang diterima (%)
10 < A ≤ 100 (%)	98-102
1 < A ≤10 (%)	97-103
0,1 < A ≤1 (%)	95-105
0,001 < A ≤ 0,1 (%)	90-107
100 ppb < A ≤ 1 ppm	80-110
10 ppb < A ≤ 100 ppb	60-115
1 ppb < A ≤ 10 ppb	40-120

Sumber: (Riyanto, 2014)

b. Ketepatan (Presisi)

Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan kedekatan nilai hasil pengukuran dari sampel yang homogen pada kondisi normal (sampel yang sama diuji secara berurutan menggunakan alat yang sama). Uji presisi dilakukan untuk mengetahui kedekatan atau kesesuaian antara hasil uji yang satu dengan yang lainnya pada serangkaian pengujian. Beberapa faktor yang dapat

mempengaruhi nilai presisi adalah kesalahan acak seperti tingkat kestabilan instrumen, suhu atau pereaksi yang digunakan, keragaman teknik dan perbedaan analis (operator).

Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). *Repeatability* adalah kesamaan metode jika dilakukan oleh analis yang sama secara berulang kali pada keadaan yang sama dan dalam interval waktu yang berdekatan. Sedangkan *reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dilakukan oleh analis berbeda pada keadaan yang berbeda, menggunakan peralatan dan bahan yang berbeda serta dilakukan di laboratorium yang berbeda pula. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) ≤2%. Semakin kecil %RSD yang dihasilkan maka semakin tinggi tingkat ketelitian suatu instrument. Presisi metode uji dapat ditentukan dengan rumus:

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} X\ 100\%$$

Keterangan

SD = Standar Deviasi

$\bar{x}$ = Nilai rata-rata

RSD = *Relative Standard Deviation*

c. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan untuk memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dengan suatu metode analisis. Data yang diperoleh dari hasil pengujian analit pada sampel dengan berbagai konsentrasi analit dihitung berdasarkan persamaan matematis dari data yang diperoleh dari hasil pengujian analit pada sampel dengan berbagai konsentrasi analit.

Sebagai parameter adanya hubungan linear, digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linear y = bx + a (b adalah *slope*, a adalah *intersep*, x adalah konsentrasi analit dan y adalah respon instrumen). Syarat keberterimaan hasil uji nilai linearitas adalah >0,9970. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai b = 0 dan r = +1 atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (Sy) (Riyanto, 2014).

d. Batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ)

Batas deteksi (LoD) adalah konsentrasi analit terendah yang dapat dideteksi dan diidentifikasi dengan mempertimbangkan tingkat kepastiannya. Batas deteksi dapat dipengaruhi oleh perubahan kecil dalam sistem analit (misalnya kemurnian reagan, kondisi, suhu, suhu dan efek matriks). Sedangkan batas kuantifikasi (LoQ) didefinisikan sebagai jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan teliti. Nilai LoD dan LoQ dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$LOD = 3SDB/b$$

$$LOQ = 10SD/b$$

Keterangan

SD = Standar deviasi

b = *Slope* dari persamaan regresi

2.5.3 Analisis Kuantitatif

2.5.3.1 KLT Densitometri

KLT Densitometri yaitu merupakan metode analisis instrumental yang mendasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan bercak pada KLT. Densitometri lebih disarankan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar

yang kecil, yang mana sebelumnya diperlukan pemisahan dengan KLT (Rohman, 2009).

Untuk evaluasi bercak hasil KLT secara densitometri, bercak di *scanning* dengan sumber sinar dalam bentuk celah (slit) yang dapat dipilih baik panjangnya maupun lebarnya. Sinar yang dipantulkan diukur dengan sensor cahaya (fotosensor). Perbedaan sinyal optik daerah yang tidak mengandung bercak dengan daerah yang mengandung bercak dihubungkan dengan banyaknya analit yang ada melalui kurva kalibrasi yang telah disiapkan dalam lempeng yang sama. Pengukuran densitometri dapat dibuat dengan absorbansi atau dengan fluoresensi (Rohman, 2009).

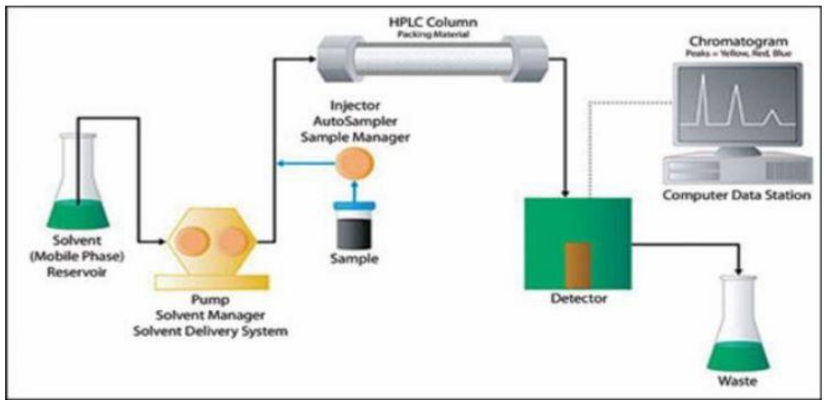
2.5.3.2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah salah satu *instrumen* yang dipakai untuk teknik analisis pemisahan secara kualitatif, kuantitatif, pemisahan/isolasi dan pemurnian. Kromatografi pertama kali ditemukan oleh Tsweet pada tahun 1903, dimana Tsweet berhasil melakukan pemisahan pigmen dari daun dengan menggunakan kolom berisi kapur (CaSO4). Tsweet juga menciptakan istilah kromatografi untuk menggambarkan daerah berwarna yang bergerak menuju bawah kolom (Angraini & Desmaniar, 2020).

Adanya proses adsorpsi dinamis dimana molekul analit akan bergerak melewati celah berpori merupakan prinsip dasar HPLC. Material kolom (fase diam) akan berinteraksi dengan komponen sampel sehingga terjadi pemisahan. Lamanya waktu interaksi (*retention time*) dipengaruhi oleh kekuatan interaksi dari material kolom dan komponen sampel (Angraini & Desmaniar, 2020).

HPLC menggunakan dua fase kerja yaitu fase gerak (*mobile phase*) dan fase diam (*stationary phase*). Fase gerak berupa cairan atau pelarut yang berfungsi untuk membawa komponen campuran

menuju detektor sedangkan fase diam adalah fase tetap didalam kolom berupa partikel dengan pori yang kecil dan memiliki area *surface* tinggi (Angraini & Desmaniar, 2020).



Gambar 2.4 Diagram Alir HPLC
Sumber: (Angraini & Desmaniar, 2020).

2.5.3.3 Spektrofotometri UV-Vis

a. Pengertian Spektrofotometri UV-Vis

Menurut Day & A.L (2002) Spektrofotometri yaitu suatu metode pengukuran absorpsi energi cahaya oleh suatu sistem kimia. Adapun Spektrofotometer yaitu suatu instrumen untuk mengukur transmitrans atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang.

Metode spektrofotometri UV-Vis digunakan bertujuan untuk menentukan kadar dengan menggunakan perbandingan absorbansi sampel dengan absorbansi baku, atau dengan menggunakan persamaan regresi linier. Kemudian persamaan kurva baku digunakan untuk menghitung kadar dalam sampel (Gandjar & Abdul, 2014).

Sinar UV dan sinar tampak yaitu energi radiasi elektromagnetik yang mampu merambat dalam bentuk gelombang. Sinar UV mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, sedangkan sinar tampak mempunyai panjang gelombang antara 400-800

nm. Warna sinar tampak dapat dihubungkan dengan panjang gelombangnya (Gandjar & Rohman, 2014).

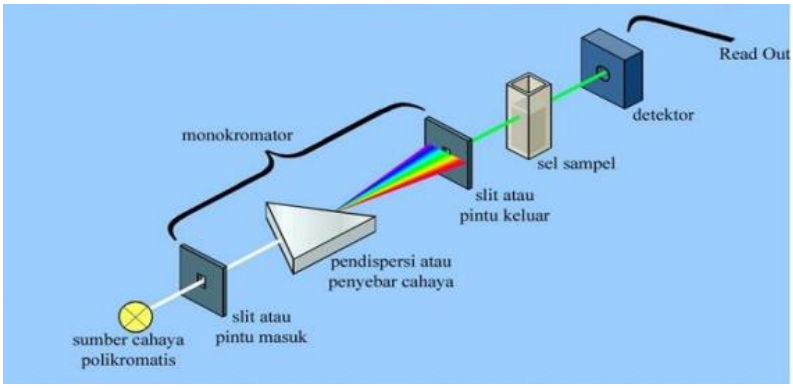
Tabel 2.6 Hubungan antara warna dengan panjang gelombang sinar tampak

Panjang gelombang	Warna yang diserap	Warna yang diamati/ warna komplementer
400-435 nm	Ungu (lembayung)	Hijau kekuningan
450-480 nm	Biru	Kuning
480-490 nm	Biru kehijauan	Orange
490-500 nm	Hijau kebiruan	Merah
500-560 nm	Hijau	Merah anggur
560-580 nm	Hijau kekuningan	Ungu (lembayung)
580-595 nm	Kuning	Biru
595-610 nm	Orange	Biru kekuningan
610-750 nm	Merah	Hijau kebiruan

(Gandjar dan Rohman, 2014).

b. Instrumen Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer untuk pengukuran di daerah spektrum UV-*Vis* terdiri dari suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang dari 200-800 nm (Gandjar & Rohman, 2015).



Gambar 2.5 Diagram alat spektrofotometer UV-Vis (*Single beam*)
Sumber: (Suhartati, 2017).

1) Sumber Sinar

Sumber sinar yaitu dua lampu yang terpisah, yang secara bersama-sama dapat menjangkau keseluruhan daerah spektrum UV dan sinar tampak (Gandjar & Rohman, 2015).

Lampu deuterium digunakan untuk daerah UV pada panjang gelombang dari 190-350 nm, sedangkan lampu halogen kuarsa atau tungsten digunakan untuk daerah visible pada panjang gelombang 350-900 nm (Gandjar & Abdul, 2014).

2) Monokromator

Monokromator yaitu tempat untuk melewatkan sinar polikromatik untuk diubah menjadi monokromatik. Monokromator terdiri atas elemen pendispersi, celah masuk (entrance slit), dan celah keluar (exit slit). Elemen pendispersi berfungsi untuk mendispersikan radiasi yang jatuh kepadanya sesuai dengan panjang gelombang. Celah masuk memungkinkan cahaya dari sumber sinar jatuh ke elemen pendispersi. Celah keluar mengizinkan hanya cahaya dengan pita yang sangat sempit yang dapat melalui sampel dan detektor.

3) Sel Sampel (Kuvet)

Kuvet yaitu tempat meletakkan sampel. Wadah sampel harus mempunyai jendela yang transparan di daerah yang dituju. Mutu data spektroskopi tergantung pada bagaimana kuvet digunakan dan dipelihara.

4) Detektor

Detektor digunakan bertujuan untuk mengukur intensitas radiasi yang mengenainya, yaitu dengan mengubah energi radiasi ke dalam energi listrik atau sinyal elektrik (Gandjar & Rohman, 2015).

5) Read Out

Read Out yaitu sistem baca yang menangkap besarnya listrik yang berasal dari detektor untuk pembacaan hasil pemeriksaan (Gandjar & Rohman, 2014).

c. Analisis Spektrofotometer UV-Vis

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan analisis dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu:

1) Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis. Hal ini dapat dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak dapat diserap di daerah UV-Vis sehingga dilakukan dengan merubah menjadi senyawa lain atau dapat direaksikan dengan pereaksi tertentu

2) Waktu operasional

Untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna, tujuannya untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi

3) Pemilihan panjang gelombang

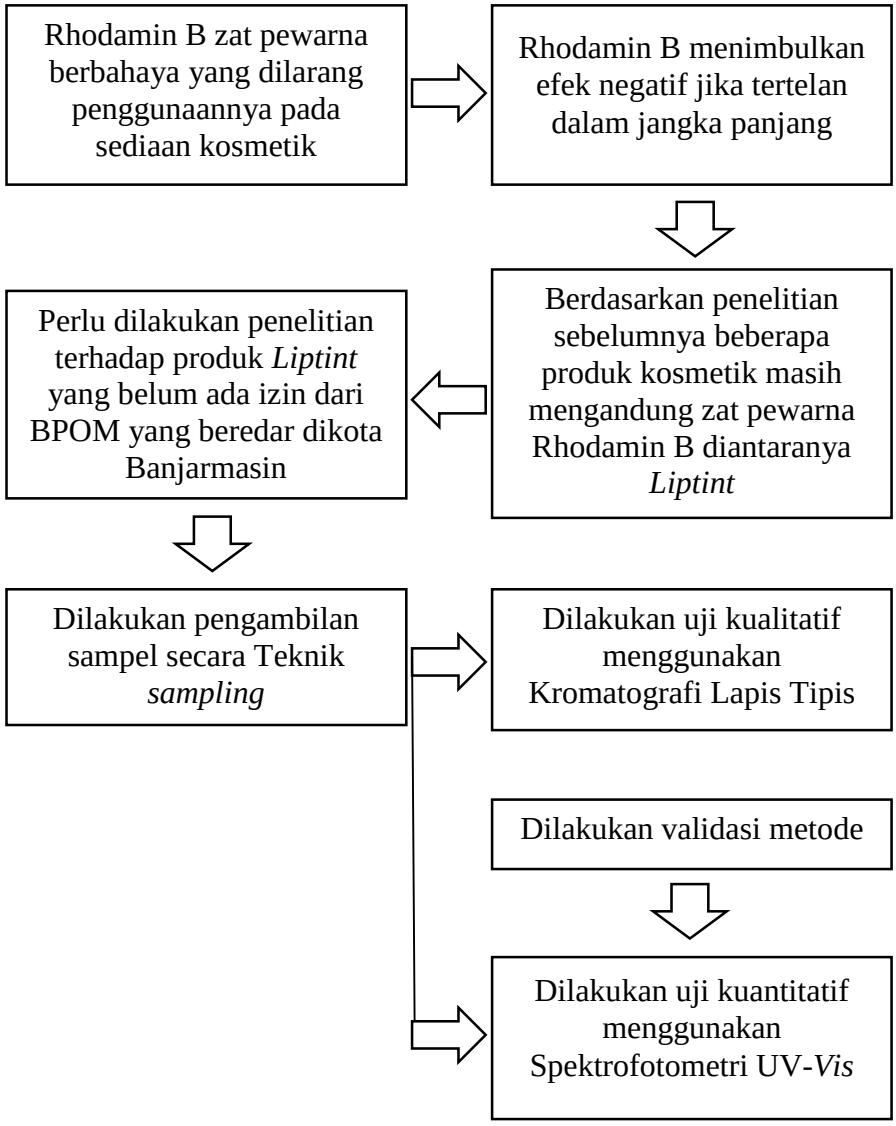
Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif yaitu panjang gelombang yang memiliki absorbansi maksimum. Pemilihan panjang gelombang maksimum, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu

4) Pembuatan kurva baku

Dibuat dengan berbagai konsentrasi dari larutan baku yang akan dianalisis. Setiap seri konsentrasi diukur absorbansinya, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x).

5) Pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan (Gandjar & Rohman, 2014).

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka konsep