

Validasi dan Penetapan Kadar Rhodamin B pada Lipstik yang Beredar di Sekitar Universitas Jember dengan Metode KLT-Densitometri (Validation TLC-densitometry method for determination of Rhodamine B in Lipstick at Jember University Area)

Risa Wahyu Ananda, Nia Kristiningrum, Yuni Retnaningtyas
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: risawahyu0208@gmail.com

Abstract

Rhodamine B is one of the synthetic dyes that forbidden in cosmetics. The study was conducted to validate TLC-densitometry method for determination Rhodamin B in lipstick at Jember University area. Samples was taken by purposive sampling method. The analyte were dissolved with ethanol 70% and cromatographed on silica Gel GF 254 TLC plate using etil asetat : metanol : amoniak in the ratio (15:3:3) (v/v/v). Then, validation and determination sample can be done using TLC-densitometry with maximum wavelength 554 nm. Method was found linear over the concentration range of 6 – 32 ng with correlation coefficient of 0,9965. Spesificity showed calculation of purity and identity more than 0.99. The limits of detection and quantitation limits obtained 0.558 and 1.86 ng/spot. The precision test which includes precision repeatability and intermediate precision, amounting to RSD 6.57% and test accuracy , resulting % recovery and RSD value of 97.74 % \pm 2.54% . Based on these results lipstick sample purposively sampled none containing rhodamine B and safe consumer use.

Keywords: TLC - densitometry , lipstick , rhodamine B , the validation method of analysis

Abstrak

Rhodamin B adalah salah satu pewarna sintetik yang tidak diperkenankan terdapat dalam kosmetika. Penelitian ini dilakukan untuk validasi metode TLC-densitometri pada penetapan kadar rhodamin B dalam lipstik di sekitar Universitas Jember. Sampel diambil dengan metode sampling purposif. Analit dilarutkan dalam etanol 70% dan menggunakan lempeng silika gel GF 254 dengan fase gerak etil asetat : metanol : amoniak in the ratio (15:3:3) (v/v/v). Kemudian validasi dan penetapan kadar sampel dapat dilakukan menggunakan KLT-Densitometri dengan panjang gelombang maksimum 554 nm. uji linieritas pada rentang 6 – 32 ng, didapatkan nilai koefisien korelasi (r) 0,9965. Uji spesifisitas menunjukkan spektra yang identik dan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi antara analit dalam sampel dengan standar. uji batas deteksi dan batas kuantisasi didapatkan 0,558 dan 1,86 ng/spot. Uji presisi yang meliputi *repeatability precision* dan *intermediate precision*, sebesar RSD 6,57 % dan uji akurasi, dihasilkan % recovery dan nilai RSD 97,74 % \pm 2,54 %. Berdasarkan hasil penelitian tersebut sampel lipstik yang disampling secara *purposive* tidak ada satupun yang mengandung rhodamin B dan aman digunakan konsumen.

Kata kunci: KLT-densitometri, lipstik, rhodamin B, validasi metode analisis

Pendahuluan

Kosmetika dikenal manusia sejak berabad-abad yang lalu. Pada jaman dahulu, tujuan penggunaan kosmetika adalah untuk

mendapatkan penampilan kulit yang sehat. Kosmetika berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 445/Menkes/Per/V/1998 adalah sediaan atau

paduan bahan yang siap digunakan pada bagian luar badan (epidermis, rambut, kuku, bibir dan organ kelamin luar), gigi dan rongga mulut untuk membersihkan, menambah daya tarik, mengubah penampilan, melindungi kulit supaya tetap dalam keadaan baik, memperbaiki bau badan tetapi tidak dimaksudkan untuk mengobati atau menyembuhkan suatu penyakit [1].

Berdasarkan UU no. 23 tahun 1992 tentang kesehatan disebutkan bahwa pendistribusian atau penyaluran kosmetika dapat dilakukan oleh pedagang besar farmasi, termasuk pula pedagang lain yang memiliki ijin. Setiap sediaan kosmetika yang akan beredar di masyarakat terlebih dahulu melewati inspeksi badan POM serta mendapatkan ijin edar dari Departemen Kesehatan Republik Indonesia [1]. Penelitian yang dilakukan Yayasan Pemberdayaan Konsumen Kesehatan (YPKK) menyebutkan bahwa, kosmetika yang beredar di pasaran masih banyak yang tidak memiliki persyaratan ijin produksi [2]. Ditambahkan pula, investigasi BPOM mengenai keberadaan rhodamin B dalam kosmetika ditemukan pada 27 merk kosmetika yang diambil secara acak dari beberapa provinsi pada tahun 2006 dan 2007 [3].

Berdasarkan Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) nomor 00386/C/SK/II/90 tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya dalam obat, makanan dan kosmetika, salah satunya adalah rhodamin B (merah K11) [1].

Secara umum, rhodamin B merupakan pewarna sintetik yang banyak digunakan dalam industri cat, tekstil dan kertas. Rhodamin B merupakan zat warna sintetik berbentuk serbuk kristal, tidak berbau, berwarna merah keunguan dan dalam bentuk larutan berwarna merah terang berpendar (berfluoresensi) [4]. Efek toksik kronik terjadi bila penggunaan warna rhodamin B pada dosis kecil yang terus menerus, sehingga tertimbun dalam tubuh akan menyebabkan gangguan fungsi hati kronik. Struktur kimia dari rhodamin B mengandung unsur N⁺ (nitronium) yang bersifat karsinogenik sehingga memacu pertumbuhan sel-sel kanker dan menyebabkan terjadinya kanker hati serta tumor hati [5].

Pada penelitian sebelumnya, telah ditemukan adanya rhodamin B dalam kosmetika lipstik batangan yang tidak memiliki keterangan produksi lengkap baik nomer produksi dan nomor batch [3]. Keberadaan rhodamin B dalam

kosmetik dapat dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT), sedangkan secara kuantitatif dapat dianalisis dengan menggunakan metode spektrofotometri uv-vis [3].

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka pada penelitian ini, akan dilakukan penetapan kadar rhodamin B dalam sampel lipstik di sekitar kompleks Universitas Jember. Pemilihan daerah populasi sampel berdasarkan tingginya konsumen pengguna kosmetika pada usia 20-30 tahun dan berasal dari kalangan mahasiswa [2]. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri. Pemilihan metode KLT-Densitometri dikarenakan kromatografi lapis tipis dapat menghasilkan pemisahan yang lebih sempurna, kepekaan yang lebih tinggi, dapat dilaksanakan dengan lebih cepat dan membutuhkan jumlah sampel yang sedikit [5].

Metode Penelitian

Alat yang digunakan adalah *scanner* Densitometri winCATS Camag, perangkat komputer dengan program winCATS, timbangan analitik Sartorius, *ultrasonic cleaner*, bejana camag, pinset, lempeng KLT Silika Gel GF₂₅₄ dan pengering.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah standart rhodamin B (Merck), lipstik, etanol 70% (teknis), amoniak p.a (Merck), metanol p.a (Sigma-Aldrich), etil asetat p.a (J.T.baker), paraffin cair, akuabides (WIDA WITM Unicap), asam klorida 4M (teknis), Na sulfat (Merck).

Sampel yang digunakan adalah lipstik batangan dengan rentang harga kurang dari Rp. 10.000 yang dijual di sekitar Universitas Jember. Metode *sampling* yang digunakan adalah metode *sampling purposive*, dengan toleransi kesalahan 5%. [6].

Alur penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan, yakni: penentuan kondisi optimum, validasi metode analisis dan tahap terakhir penetapan kadar rhodamin B pada sampel lipstik yang beredar di sekitar Universitas Jember dengan menggunakan metode KLT-densitometri.

Tahapan pertama adalah penentuan kondisi optimum yang meliputi; optimasi pelarut, optimasi eluen, optimasi konsentrasi uji, serta penentuan panjang gelombang maksimum. Optimasi pelarut yang dilakukan berdasarkan sifat kelarutan rhodamin B yang larut dalam alkohol. Optimasi eluen didasarkan pada

penelitian sebelumnya, dengan komposisi utama etil asetat : metanol : amoniak [5]. Optimasi penentuan konsentrasi uji dilakukan berdasarkan konsentrasi pada penelitian sebelumnya dengan macam konsentrasi, yakni: 3 ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm, dan 15 ppm [3]. Tahapan optimasi terakhir adalah penentuan panjang gelombang maksimum yang dilakukan dengan membuat larutan standar konsentrasi tertentu lalu di *scanning* pada panjang gelombang 400-800 nm.

Tahapan penelitian selanjutnya adalah validasi metode analisis, yang meliputi; uji spesifisitas, uji linieritas dan rentang, uji kepekaan (batas deteksi dan batas kuantisasi), uji presisi dan uji akurasi.

Hasil Penelitian

Penelitian yang dilaksanakan terbagi dalam beberapa tahapan, yakni; optimasi kondisi analisis, validasi metode analisis, dan penetapan kadar rhodamin B dalam lipstik.

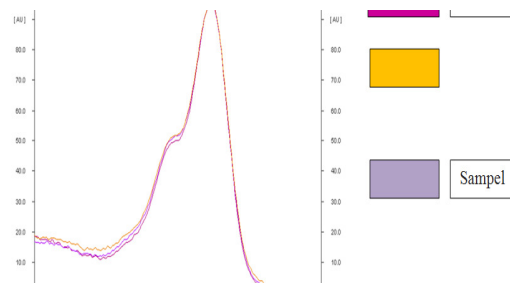
Optimasi kondisi analisis ditujukan untuk mendapatkan kondisi yang optimum guna didapatkannya data yang dapat dipertanggungjawabkan. Hasil optimasi kondisi analisis ditunjukkan pada Tabel 1.

Tahapan selanjutnya adalah uji validasi metode analisis. Parameter uji validasi metode analisis yang dilakukan, meliputi uji spesifisitas, uji linieritas, uji kepekaan (batas deteksi dan batas kuantisasi), uji presisi dan uji akurasi. Hasil uji validasi ditunjukkan pada Gambar 1, Tabel 2, Tabel 3, Tabel 4, Tabel 5, Tabel 6, Tabel 7, dan Tabel 8.

Tahapan terakhir adalah penetapan kadar rhodamin B dalam lipstik yang di sampling secara purposif. Hasil penetapan kadar ditunjukkan pada Tabel 9.

Tabel 1. Hasil kondisi analisis optimum

No.	Kondisi Analisis	HasiOptimasi
1.	Pelarut	Etanol 70%
2.	Eluen / Fase Gerak	Etil Asetat p.a : Metanol : Amoniak p.a (v/v/v) (15 : 3 : 3)
3.	Lama Pencampuran / <i>stirer</i>	2 menit
4.	Panjang Gelombang maksimum	554 nm
5.	Konsentrasi Uji	9 ppm



Gambar 1. Hasil uji spesifisitas

Tabel 2. Hasil uji *purity*

Track	Identitas	Rf	r (s,s)	r (m,e)	Purity
1	Standar	0,74	0,9998	0,9986	Ok
2	Sampel	0,74	0,9999	0,9979	Ok
5	Standar	0,75	0,9999	0,9972	Ok

Tabel 3. Hasil uji *identity*

Track	Identitas	Rf	r (s,s)	r (s,a)	Identity
1	Standar	0,74	0,9992		Rhodamin B
2	Sampel	0,74	0,9992	0,9995	Rhodamin B
5	Standar	0,75	0,9992		Rhodamin B

Tabel 4. Hasil uji linieritas

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
3	6	251,41
6	12	434,67
7,5	15	561,2
9	18	680,24
12	24	794,47
14	28	947
16	32	1079,03

Hasil regresi linier $y = 75,21395000 + 31,27853000 X$
Koefisien korelasi (r) = 0,9965

Nilai V_{xo} 4,352% dan nilai X_p 4,42 ng

Tabel 5. Hasil uji batas deteksi dan batas kuantisasi

Konsentrasi (ppm)	Massa (ng)	Area
1,02	2,05	90,1
1,23	2,46	115,46
1,84	3,68	196,45
2,04	4,09	222,67
2,41	4,82	255,64
2,61	5,22	290,15

Hasil regresi $Y = - 35, 834 + 62, 057 X$

Koefisien korelasi (r) = 0,998376 (> 0,99)

X_p value = 0, 55831920 (< 2, 050000)

Tabel 6. Hasil uji parameter *repeatability precision*

Penimbangan (mg)	Massa Hasil Percobaan (mg)	Kadar b/b
503,4	$1,892 \times 10^{-5}$	0,0188 %
503,9	$1,979 \times 10^{-5}$	0,0196 %
504,2	$2,100 \times 10^{-5}$	0,0208 %
503,4	$2,175 \times 10^{-5}$	0,0216 %
504,7	$2,169 \times 10^{-5}$	0,0215 %
504,1	$2,274 \times 10^{-5}$	0,02%
Rata – Rata		0,0225 %
RSD / CV		6,612 %

Tabel 7. Hasil uji parameter validasi *intermediate precision*

Hari ke-	% RSD	% b/b
I	6,612 %	0,0208 %
II	6,62 %	0,0272 %
III	6,51 %	0,0188 %
Rata- Rata	6,57 %	0,0222 %

Tabel 8. Hasil uji akurasi

Penambahan	Konsentrasi yang ditambahkan	Mean Recovery	RSD %
78 %	7 ppm	95,86 % 98,37 % 97,22 %	1,29 %
100 %	9 ppm	102,48 % 99,1 % 95,95 %	3,35 %
111 %	10 ppm	94,01 % 99,81 % 97,13 %	2,98 %
Rata - Rata Mean Recovery		97,74 % \pm 2,54%	

Tabel 9. Penetapan kadar rhodamin B dalam sampel lipstik batangan

Sampel	Height	X (calc)	Area	X (calc)	Hasil
A	-	-	-	-	Negatif
B	-	-	-	-	Negatif
C	-	-	-	-	Negatif
D	-	-	-	-	Negatif
E	-	-	-	-	Negatif
F	-	-	-	-	Negatif
G	-	-	-	-	Negatif
H	-	-	-	-	Negatif
I	-	-	-	-	Negatif
J	-	-	-	-	Negatif
K	-	-	-	-	Negatif
L	-	-	-	-	Negatif
M	-	-	-	-	Negatif
N	-	-	-	-	Negatif

Pembahasan

Tahapan pertama yakni optimasi kondisi analisis. Optimasi kondisi analisis dilakukan untuk mendapatkan data yang dapat dipertanggungjawabkan yang ditunjukkan dengan parameter efisiensi kromatogram yakni, nilai HETP terkecil, nilai N terbesar dan nilai Rf dalam rentang 0,2-0,8. Kondisi analisis optimum ditunjukkan pada Tabel 1. Fase gerak optimum menggunakan etil asetat : metanol : amoniak (15:3:3) (v/v), pelarut optimum etanol 70%, panjang gelombang maksimum 554 nm, dan konsentrasi uji terpilih 9 ppm.

Penelitian selanjutnya, validasi metode analisis. Pengujian parameter uji validasi yang pertama adalah uji spesifisitas. Uji parameter spesifisitas dilakukan dengan membandingkan spektra analit yang terdapat pada standar dengan sampel, serta membandingkan nilai kemurnian dan identitas dari *track* sampel dan standar.

Pada uji kemurnian pada Gambar 1, Tabel 2 dan Tabel 3, dilakukan dengan cara membandingkan spektra pada posisi *peak*, yaitu posisi *start* (s), posisi puncak/maksimum (m) dan posisi *end* (e). Kemurnian dilihat berdasarkan nilai $r(m,e)$. Nilai $r(m,e)$ menunjukkan adanya korelasi antara spektra pada posisi puncak (m) dan akhir puncak (e). Dalam tabel tersebut diketahui bahwa nilai korelasi $r(m,e)$ rhodamin B lebih dari 0,99 yang berarti sampel murni. Sedangkan untuk uji identitas dilakukan dengan membandingkan nilai $r(s,s)$ dan $r(s,a)$. Nilai $r(s,s)$ merupakan nilai yang menunjukkan adanya korelasi spektra antara *track* standar dan sampel yang memiliki konsentrasi yang sama. Nilai $r(s,a)$ menunjukkan korelasi spektra antara standar dan *track* analit dalam sampel. Berdasarkan tabel di atas nilai korelasi yang didapatkan lebih dari 0,990 yang berarti sampel identik dengan standar rhodamin B.

Parameter uji validasi selanjutnya, yakni uji linieritas pada Tabel 4. Parameter uji linieritas yang digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier, yakni $y = a + bX$. Parameter lain yang dapat digunakan berdasarkan program *validation method of analysis* adalah parameter nilai regresi koefisien korelasi r, nilai standar deviasi (V_{x0}) dan nilai koefisien variasi (Xp). Berdasarkan Tabel 4 didapatkan hasil uji, antara lain; koefisien korelasi (r) 0,9965 dengan kriteria persyaratan $\geq 0,99$; nilai standar deviasi (V_{x0}) 4,352 dari kriteria persyaratan $< 5\%$; dan parameter nilai

koefisien korelasi (X_p) 4,42 ng dengan kriteria persyaratan lebih kecil dari konsentrasi terkecil analit yang di analisis yakni 6 ng. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa uji linieritas memenuhi kriteria persyaratan yang dipersyaratkan.

Uji kepekaan yang meliputi, batas deteksi dan batas kuantisasi didapatkan hasil pada Tabel 5. Kurva baku yang digunakan pada uji kepekaan dengan rentang konsentrasi 1,02 ppm – 2,61 ppm didapatkan nilai batas deteksi dari nilai X_p sebesar 0,558 ng dan nilai batas kuantisasi sebesar 1,86 ng.

Parameter validasi presisi berdasarkan ICH biasanya dilakukan dalam dua tahap yakni, *repeatability* dan *intermediate precision*. Data yang dapat digunakan sebagai hasil diekspresikan dengan nilai SD atau RSD [8]. Parameter validasi *repeatability precision* dilakukan dengan melakukan replikasi penimbangan sebanyak 6 kali, pada konsentrasi uji analit 9 ppm. Kemudian, sebagai *intermediate precision* dilakukan pada 3 hari yang berbeda. Kriteria penerimaan untuk analit rhodamin B pada konsentrasi 9 ppm adalah $RSD \leq 7,3 \%$ [9].

Berdasarkan Tabel 6 dan Tabel 7 uji *repeatability* dan *intermediate precision* dapat diketahui bahwa nilai RSD dari ketiga hari atau uji *intermediate precision* 6,57 %. Nilai RSD yang didapat telah memenuhi kriteria persyaratan uji presisi untuk rhodamin B yakni 7,3 %. Dengan demikian, bahwa metode ini dapat memberikan hasil analisis yang presis.

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan, dengan batas nilai % *recovery* untuk konsentrasi uji 9 ppm sebesar 80-110%. Uji akurasi dilakukan dengan menghitung % *recovery* yang dihasilkan dari penambahan standar sebanyak 78%, 100% dan 111% dari kadar analit dalam konsentrasi uji.

Persyaratan uji akurasi untuk konsentrasi rhodamin B 9 ppm adalah *mean recovery* yang berada dalam rentang 80 – 110 % dengan nilai RSD 7,3 %. Dari Tabel 10, dapat diketahui bahwa rhodamin B dihasilkan % *recovery* dan nilai RSD 97,74 % \pm 2,54 %. Hasil yang didapatkan tersebut memenuhi persyaratan uji akurasi. Dari hasil yang didapatkan di atas, dapat disimpulkan bahwa metode analisis menghasilkan data yang akurat.

Berdasarkan serangkaian uji parameter validasi yang meliputi, uji selektivitas dan

spesifisitas, linieritas, batas deteksi dan batas kuantisasi, presisi dan akurasi diketahui bahwa metode analisis rhodamin B dengan KLT Densitometri menghasilkan analisis yang selektif, spesifik, linier, peka, presis, dan akurat.

Tahap selanjutnya dalam penelitian ini adalah pengaplikasian serta penetapan kadar rhodamin B dalam sampel lipstik batangan dengan menggunakan KLT densitometri. Dari hasil penetapan kadar rhodamin B dalam sampel tersebut diketahui bahwa, sampel lipstik yang di analisis negatif atau tidak mengandung rhodamin B.

Berdasarkan tahap-tahap penelitian, mulai dari optimasi kondisi analisis optimum, uji validasi metode analisis dan penetapan kadar rhodamin B pada sampel lipstik yang dijual di sekitar Universitas Jember diketahui bahwa, semua data yang dihasilkan pada uji parameter validasi telah memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan, sehingga metode yang dikembangkan ini dapat dinyatakan valid dan memberikan hasil yang benar untuk analisis rhodamin B dalam sampel lipstik.

Simpulan dan Saran

Kesimpulan dari penelitian ini yakni, Metode KLT-Densitometri untuk penetapan kadar rhodamin B dalam sampel memenuhi persyaratan uji validasi antara lain; uji spesifisitas didapatkan spektra yang identik dan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi antara analit dalam sampel dengan standar, uji linieritas didapatkan nilai koefisien korelasi (r) 0,9965, nilai (V_{x_0})4,352 %, dan nilai (X_p) 4,42 ng, uji batas deteksi dan batas kuantisasi didapatkan 0,558 ng dan 1,86 ng, selanjutnya uji presisi yang meliputi *repeatability precision* dan *intermediate precision*, hasil yang didapatkan sebesar RSD 6,57 % dan tahap terakhir yakni akurasi, dihasilkan % *recovery* dan nilai RSD 97,74 % \pm 2,54 %. Hasil penetapan kadar, maka dapat disimpulkan sampel lipstik yang disampling secara *purposive* di sekitar Universitas Jember tidak ada yang mengandung rhodamin B, sehingga aman untuk digunakan konsumen kosmetika. Saran yang diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah penetapan kadar rhodamin B dalam jenis sampel kosmetika lain seperti kosmetika lipstik tetapi, dalam bentuk lipstik cair. Serta, jumlah sampel yang diambil lebih banyak sehingga hasilnya lebih representatif.

Daftar Pustaka

- [1] Widana, G. A. B. dan Yuningrat, N. W. Analisis Bahan Pewarna Berbahaya Pada Sediaan Kosmetika di Wilayah Kecamatan Buleleng Kabupaten Buleleng. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Sains dan Humaniora*. 2007; 1 (1); 26-36.
- [2] Syahrída, et. Al.,. Perlindungan Hukum Terhadap Konsumen Pengguna Produk Kosmetik Pemutih Wajah di Kota Banjarmasin. *Jurnal Cita Hukum*. 2010; 2(1): 1-38.
- [3] Putri,W.K. A. "Pemeriksaan Penyalahgunaan Rhodamin B Sebagai Pewarna Pada Sediaan Lipstik yang Beredar di Pusat Pasar Kota Medan". Tidak dipublikasikan. Skripsi. Medan : Program Studi Strata Satu Farmasi Universitas Sumatra Utara. 2009.
- [4] Mamoto, L. V. dan Citraningtyas, F. G. Analisis Rhodamin B Pada Lipstik yang Beredar di Pasar Kota Manado. *Jurnal I Imiah Farmasi*. 2013; 2 (2): 61-66.
- [5] Mukaromah, A. H. dan Maharani, E. T. Identifikasi Zat Warna Rhodamin B Pada Lipstik Berwarna Merah. *Jurnal Analisis Kesehatan*. 2008; 1(1): 34-40.
- [6] Nursalam. *Konsep dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan Edisi 2*. Jakarta: Salemba Medika. 2008.
- [7] Gandjar, I. G. dan Rohman, A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Belajar. 2011.
- [8] Ferenczi-Fodor, K., Vegh, Z. dan Nagy-Turak, A. Validation and Quality Assurance of Planar Chromatographic Procedures in Pharmaceutical Analysis. *Journal of AOAC International*. 2001;84 (4): 1265-1276.
- [9] Indrayanto, D dan Yuwono, M. *Validation of Chromatographic Method of Analysis in Encyclopedia of Chromatograph (ed. J. Cazes)*. New York: Marcel-Dekker, Inc. 2005.