

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental yang ditujukan untuk mengidentifikasi merkuri menggunakan nanopartikel perak dengan bioreduktor ekstrak kulit buah sirsak secara kualitatif untuk mengetahui ada atau tidaknya merkuri pada *whitening body lotion*. Hasil pengujian ini nantinya akan dibandingkan dengan pereaksi kalium iodide untuk mengetahui kevalidan hasil pengujian dengan nanopartikel perak.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni 2023 hingga bulan Oktober 2023 bertempat di:

1. Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Poltekkes Kemenkes Malang untuk pembuatan simplisia dan ekstrak kulit buah sirsak.
2. Laboratorium Analisis Makanan dan Minuman Poltekkes Kemenkes Malang untuk pembuatan nanopartikel perak, destruksi sampel, dan pengujian sampel.
3. Laboratorium Kimia Poltekkes Kemenkes Malang untuk karakterisasi nanopartikel perak dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Pada penelitian ini diperlukan beberapa peralatan, diantaranya pisau, talenan, neraca digital (GSF), oven (Thermo Fisher), loyang, grinder, ayakan mesh 200, labu ukur 100 mL (Iwaki), neraca analitik (Ohaus), spatula, kaca arloji, Erlenmeyer 250 mL (Iwaki), batang pengaduk, corong gelas, beaker glass 50 mL (Iwaki), labu ukur 250 mL (Iwaki), pipet ukur 10 mL, bola hisap, pipet tetes, botol kaca gelap 100 mL, mikropipet 100 – 1000 μ L (Dragon Lab), gelas ukur 50 mL (Iwaki), hotplate (Thermo scientific), spektrofotometer UV-Vis (Biobase), magnetic stirrer, labu ukur 10 mL

(Iwaki), mikropipet 20 – 200 μL (Dragon Lab), tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi, tabung digesti tertutup, *digestive furnace* (Baskara), labu ukur 50 mL (Iwaki), lemari pendingin.

3.3.2. Bahan

Pada penelitian ini diperlukan beberapa bahan, diantaranya buah sirsak, aquades, etanol 96%, aluminium foil, kertas saring, AgNO_3 , HgCl_2 (Smart-Lab), PbCl_2 (Smart-Lab), CdSO_4 (Smart-Lab), sampel *whitening body lotion*, asam nitrat pekat, dan kalium iodide (Smart-Lab).

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variable yang nilainya mempengaruhi variable lainnya. Pada penelitian ini terdapat dua variable bebas yaitu volume larutan AgNO_3 2 mM yang ditambahkan pada pembuatan nanopartikel perak dan sampel *whitening body lotion* tanpa izin edar yang dijual di *E-Commerce*.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variable yang nilainya tergantung dari nilai variable lainnya. Variabel terikat pada penelitian ini adalah absorbansi nanopartikel perak yang terbentuk pada panjang gelombang 450 nm serta logam berat merkuri.

3.5. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1. Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Pengukuran
Volume larutan AgNO_3 2 mM	Volume larutan AgNO_3 2 mM yang digunakan untuk	Gelas ukur	Volume larutan AgNO_3 2 mM (mL)	Rasio

(Independen)	pembuatan nanopartikel perak dengan variasi 20, 30, dan 40 mL			
<i>Whitening body lotion</i> (Independen)	Salah satu jenis produk pemutih kulit tanpa izin edar yang dijual di <i>E-Commerce</i> dengan kriteria lima penjualan terlaris dalam <i>whitening body lotion</i> dosis tinggi	Observasi	Didapatkan sampel <i>whitening body lotion</i>	Nominal
Absorbansi nanopartikel perak yang terbentuk pada Panjang gelombang 450 nm (Dependen)	Menentukan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 450 nm dari nanopartikel perak yang terbentuk pada masing-masing variasi larutan AgNO_3 2 mM dengan spektrofotometer UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis	Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan dalam bentuk absorbansi	Interval

Kandungan logam berat merkuri (Dependen)	Menentukan ada atau tidaknya merkuri dalam <i>whitening body lotion</i> tanpa izin edar	Nanopartikel perak	Positif : adanya perubahan warna menjadi putih dan semakin memudar Negative : tidak berubah warna	Nominal
--	---	--------------------	--	---------

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Sampel berupa *whitening body lotion* didapatkan dari *E-commerce* dengan menggunakan teknik sampling berupa *purposive sampling*. Sampel yang dipilih merupakan *whitening body lotion* dosis tinggi yang tidak memiliki izin edar dengan kriteria lima penjualan terlaris dalam *whitening body lotion* dosis tinggi. Sampel yang telah didapatkan kemudian disimpan pada tempat yang kering bersih, dan terhindar dari sinar matahari langsung hingga dilakukan analisa.

3.6.2. Pembuatan serbuk simplisia kulit buah sirsak (Asworo & Widwiasuti, 2023b)

Tanaman yang digunakan dalam proses pembuatan nanopartikel perak adalah *Annona muricata* atau yang dikenal dengan tanaman sirsak. Bagian tanaman yang digunakan adalah kulit buah sirsak. Buah sirsak diperoleh dari pasar Kepanjen, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Sebanyak 3 kg buah sirsak dikupas kulit buahnya kemudian dicuci hingga bersih, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan pada suhu 60°C. Kulit buah sirsak yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan grinder dan diayak dengan ayakan 200 mesh. Hasil ayakan serbuk disimpan dalam wadah kedap udara.

3.6.3. Pembuatan ekstrak kulit buah sirsak (Asworo & Widwiastuti, 2023b)

3.6.3.1. Pembuatan pelarut

Pelarut aquadest:etanol (7:1) dibuat dengan mencampurkan 43,8 mL aquades dengan 6,2 mL etanol dan dimasukkan dalam gelas kimia.

3.6.3.2. Ekstraksi

Ekstrak kulit buah sirsak dibuat dengan menimbang serbuk simplisia kulit buah sirsak sebanyak 5 gram lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 50 mL pelarut yang merupakan campuran aquadest dan etanol 96% (7 : 1). Selanjutnya campuran tersebut dimaserasi pada tempat gelap selama 24 jam. Ekstrak kulit buah sirsak diperoleh dengan menyaring maserat dengan menggunakan kertas saring dan disimpan dalam botol kaca gelap.

3.6.4. Pembuatan nanopartikel perak secara *green synthesis*

3.6.4.1. Pembuatan larutan AgNO₃ 2 mM (Asworo et al., 2023b)

Pembuatan nanopartikel perak dilakukan dengan membuat terlebih dahulu larutan AgNO₃ 2 mM. Larutan AgNO₃ 2 mM dibuat dengan menimbang 0,085 gram serbuk AgNO₃, kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 250 mL. Larutan perak nitrat disimpan dalam botol kaca gelap.

3.6.4.2. Optimasi komposisi nanopartikel perak (Kasim et al., 2020)

Nanopartikel perak dibuat dengan mencampurkan 1 mL ekstrak kulit buah sirsak dengan dengan beberapa variasi volume larutan AgNO₃ 2 mM, yaitu 20 mL, 30 mL, dan 40 mL yang ditempatkan pada beaker glass yang berbeda dengan tiga kali replikasi. Campuran kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan dipanaskan di atas *hotplate* pada suhu 60°C hingga terjadi perubahan warna. Nanopartikel perak kemudian disimpan dalam botol kaca gelap selama 24 jam sebelum dilakukan karakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.6.5. Karakterisasi nanopartikel perak (Asworo et al., 2023b)

Hasil sintesis nanopartikel perak yang sebelumnya telah disimpan dalam botol kaca gelap selama 24 jam kemudian dilakukan karakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 200 – 700 nm. Karakteristik larutan diamati dari

perubahan warna dan serapan UV-Vis maksimum pada waktu ke 1 hari, 3 hari, 5 hari, 7 hari, dan 9 hari.

3.6.6. Pembuatan larutan baku induk merkuri (Hg) 1000 ppm

Larutan induk merkuri dibuat dengan menimbang HgCl_2 sebanyak 0,1 gram. Serbuk HgCl_2 dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL, dilarutkan dengan 20 mL aquadest, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan dicukupkan volumenya hingga batas dengan aquades.

3.6.7. Pembuatan larutan baku induk Pb 1000 ppm

Larutan induk merkuri dibuat dengan menimbang PbCl_2 sebanyak 10 mg. Serbuk PbCl_2 dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL, dilarutkan dengan 2 mL aquadest, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya hingga batas dengan aquades.

3.6.8. Pembuatan larutan baku induk Cd 1000 ppm

Larutan induk merkuri dibuat dengan menimbang CdSO_4 sebanyak 10 mg. Serbuk CdSO_4 dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL, dilarutkan dengan 2 mL aquadest, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya hingga batas dengan aquades.

3.6.9. Pembuatan pereaksi kalium iodide 0,5N (Pradiningsih et al., 2022b)

Kalium iodide ditimbang sebanyak 2,075 gram kemudian dilarutkan dengan 10 mL aquadest. Kalium iodide yang telah larut kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan dengan aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

3.6.10. Uji Validasi

Setiap larutan analit HgCl_2 , PbCl_2 , dan CdSO_4 dengan konsentrasi 1000 ppm sebanyak 2 tetes ditambahkan dengan 2 tetes nanopartikel perak yang optimum. Perubahan warna yang terjadi diamati secara visual. Apabila terdapat perubahan warna dari coklat menjadi putih dan semakin memudar hingga tidak

berwarna menunjukkan adanya merkuri, sedangkan apabila tidak terdapat perubahan warna menunjukkan merupakan hasil deteksi pada Pb^{2+} dan Cd^{2+} .

3.6.11. Uji Organoleptis

Untuk melakukan uji organoleptis, sampel yang berupa *whitening body lotion* diamati dari warna, bau, dan tekstur.

3.6.12. Destruksi sampel (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2011)

Sampel berupa *whitening body lotion* tanpa izin edar yang didapatkan dari *E-Commerce* dengan kriteria 5 produk penjualan terlaris dalam *whitening body lotion* dosis tinggi. Sampel yang telah dikumpulkan kemudian disimpan di tempat yang kering, bersih, dan tidak terkena cahaya matahari langsung hingga analisis dilakukan.

Sebelum dilakukan pengujian, sampel didestruksi basah terlebih dahulu. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram, dimasukkan ke dalam tabung digesti tertutup, dan ditambahkan 7 mL asam nitrat pekat kemudian didestruksi pada suhu maksimum $60^{\circ}C$ selama tidak kurang dari 3 jam. Setelah mencapai suhu ruang, hasil destruksi diencerkan dengan aquades hingga 50 mL dan didiamkan dalam lemari pendingin selama 24 jam kemudian difiltrasi. Filtrat yang didapatkan siap untuk dilakukan analisis.

3.6.13. Uji kualitatif sampel

3.6.13.1. Uji kualitatif dengan nanopartikel perak

Pengujian kualitatif dilakukan pada larutan sampel, kontrol positif dan kontrol negatif. Untuk larutan sampel, lima jenis larutan sampel yang telah dipreparasi sebanyak 2 tetes ditambahkan dengan 2 tetes nanopartikel perak. Untuk kontrol positif, lima jenis larutan sampel yang telah dipreparasi sebanyak 2 tetes ditambahkan dengan 2 tetes larutan baku merkuri 1000 ppm dan ditambahkan dengan 2 tetes nanopartikel perak. Pengujian juga dilakukan pada larutan standar merkuri 1000 ppm dengan sebanyak 2 tetes larutan standar merkuri 1000 ppm ditambahkan 2 tetes nanopartikel perak. Kemudian untuk control negative, hanya menambahkan 4 tetes nanopartikel perak dalam tabung reaksi. Perubahan warna

larutan sampel yang terjadi diamati secara visual kemudian dibandingkan dengan perubahan warna yang terjadi pada kontrol positif dan kontrol negative. Adanya perubahan warna menjadi putih dengan semakin memudar hingga tidak berwarna menunjukkan adanya merkuri (Prasetia et al., 2019).

3.6.13.2. Uji kualitatif dengan pereaksi kalium iodide

Pengujian kualitatif dilakukan pada larutan sampel, kontrol positif dan kontrol negatif. Untuk larutan sampel, lima jenis larutan sampel yang telah dipreparasi sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL pereaksi KI secara perlahan melalui dinding tabung reaksi. Untuk control positif, lima jenis larutan sampel yang telah dipreparasi sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL larutan baku merkuri 1000 ppm dan ditambahkan dengan 1 mL pereaksi KI secara perlahan melalui dinding tabung reaksi. Pengujian juga dilakukan pada larutan standar merkuri 1000 ppm dengan mengambil sebanyak 1 mL larutan standar merkuri 1000 ppm ditambahkan 1 mL pereaksi KI secara perlahan melalui dinding tabung reaksi. Kemudian untuk kontrol negatif, hanya menambahkan 1 mL pereaksi KI dalam tabung reaksi. Perubahan warna larutan sampel yang terjadi diamati secara visual kemudian dibandingkan dengan perubahan warna yang terjadi pada kontrol positif dan kontrol negative. Adanya endapan berwarna merah menunjukkan adanya merkuri (Svehla, 1985).

3.7. Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Data diperoleh dari pengujian sampel di laboratorium dengan menggunakan metode kolorimetri. Analisis data yang diperoleh disajikan dalam bentuk gambar, tabel dan deskripsi hasil dari proses pengujian kualitatif.

Metode analisis data yang digunakan secara kualitatif dilakukan dengan pengamatan hasil uji kolorimetri merkuri menggunakan nanopartikel perak dan juga larutan KI 0,5N, di mana untuk nanopartikel perak adanya merkuri ditunjukkan dengan berubahnya warna larutan menjadi putih dan memudar hingga tidak berwarna (Prasetia et al., 2019). Sementara untuk larutan KI 0,5N adanya merkuri ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah (Svehla, 1985).

Data yang diperoleh dari optimasi komposisi pembuatan nanopartikel perak dan hasil positif maupun negative pada pengujian kualitatif merkuri akan disajikan dalam tabel sebagai berikut:

Tabel 3. 2. Penyajian data pengamatan hasil sintesis AgNPs

Komposisi AgNPs	Waktu Pengamatan					
	Hari ke-0	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-5	Hari ke-7	Hari ke-9
1:20						
1:30						
1:40						

Tabel 3. 3. Pengolahan data hasil karakterisasi nanopartikel perak dengan spektrofotometer UV-Vis

Tanggal :
Pembacaan :
Replikasi :

λ (nm)	Volume (mL)	Abs.	Volume (mL)	Abs.	Volume (mL)	Abs.
300						
350						
400						
450						
500	20		30		40	
550						
600						
650						
700						

Tabel 3. 4. Penyajian data hasil uji organoleptis sampel

Kode Sampel	Hasil Pengamatan		
	Warna	Bau	Tekstur
A			
B			
C			
D			
E			

Tabel 3. 5. Penyajian data hasil uji kolorimetri sampel dengan AgNPs dan/ KI

Nama Sampel	Hasil Uji Sampel	Keterangan
Kontrol positif		
Kontrol negative		
A		
B		
C		
D		
E		