

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan yaitu berjenis penelitian deskriptif menggunakan sampel 5 krim pemutih wajah yang diedarkan di *online shop K*. Metode yang digunakan pada penelitian ialah analisis kualitatif dengan KLT dan *scanning* panjang gelombang (λ) dengan spektrofotometri UV-Vis serta kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui kandungan senyawa asam retinoat serta hidrokuinon pada sampel.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Biofarmakologi Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Waktu pelaksanaan dimulai dari bulan Maret hingga Juli tahun 2023.

C. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 5 krim pemutih wajah dengan label BPOM (sampel A, B dan C) dan tanpa label BPOM (sampel D dan E) yang dibeli dari *online shop K*. Teknik yang digunakan dalam mengambil sampel adalah *purposive sampling*. Sampel mengacu pada kriteria inklusi serta eksklusi. Kedua kriteria tersebut digunakan untuk memutuskan apakah sampel dapat digunakan atau tidak. Kriteria inklusi merupakan kriteria yang jika terpenuhi dapat mengarah pada objek penelitian potensial. Sementara itu, kriteria eksklusi menyatakan bahwa jika ditemukan membuat objek pada penelitian tidak dapat digunakan.

1. Kriteria inklusi

- a. Krim pemutih wajah yang diedarkan di *online shop K*.
- b. Krim pemutih wajah berlabel BPOM dan tidak berlabel BPOM.

- c. Krim pemutih wajah yang memiliki kisaran harga produk Rp 20.000 – Rp 40.000.
 - d. Krim pemutih wajah dengan jumlah pembeli lebih dari 50.
 - e. Merek yang berbeda-beda.
 - f. Krim pemutih wajah diedarkan di dalam negeri.
2. Kriteria eksklusi
 - a. Krim pemutih wajah melebihi tanggal kedaluwarsa.
 - b. Krim pemutih wajah berasal dari satu toko yang sama.
 - c. Krim pemutih wajah yang diterima dalam kondisi rusak.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas
Sampel produk krim pemutih wajah dan toko yang ada di *online shop K*.
2. Variabel terikat
Kandungan dan kadar senyawa asam retinoat serta hidrokuinon.
3. Variabel terkendali
Tempat pengambilan sampel (*online shop K*), harga sampel, jumlah pembeli, sampel berlabel serta tidak berlabel BPOM dan bentuk sediaan sampel.

E. Definisi Operasional

1. Sampel krim pemutih wajah yang digunakan berjumlah 5 sampel dan diperoleh dari *online shop K*.
2. Metode analisis kualitatif yang digunakan guna mengetahui kandungan asam retinoat pada sampel adalah kromatografi lapis tipis (KLT) serta *scanning* λ pada spektrofotometer UV-Vis dengan membandingkan sampel terhadap larutan standar asam retinoat.
3. Metode analisis kualitatif yang digunakan untuk mengetahui kandungan hidrokuinon pada sampel adalah kromatografi lapis tipis (KLT), uji tabung menggunakan reagen FeCl_3 dan Ag-ammoniakal serta *scanning* λ pada spektrofotometer UV-Vis dengan membandingkan sampel terhadap larutan standar hidrokuinon.

4. Metode analisis kuantitatif yang digunakan guna mengetahui kandungan asam retinoat dan hidrokuinon pada sampel adalah spektrofotometri UV-Vis.
5. Hasil analisis kualitatif dengan metode yang digunakan kromatografi lapis tipis ditunjukkan oleh nilai Rf.
6. Hasil analisis kuantitatif dengan metode yang digunakan spektrofotometri UV-Vis ditunjukkan oleh nilai persen (%b/b).

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada proses preparasi sampel, uji kualitatif, pembuatan larutan baku dan uji kuantitatif senyawa asam retinoat serta hidrokuinon terhadap krim pemutih wajah adalah alat gelas (Iwaki Pyrex), ultrasonikator *water bath*, timbangan analitik (Ohaus), penggaris, pensil, lampu UV, *chamber* KLT (Camag), pipa kapiler dan spektrofotometer UV-Vis (Genesys).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam proses preparasi sampel, uji kualitatif dan uji kuantitatif pada analisis senyawa asam retinoat dan hidrokuinon adalah 5 sampel krim pemutih wajah, alumunium foil, metanol *p.a* (Merck), kertas saring *Whatman* No.41, es, pereaksi FeCl₃ (Merck), Ag-ammoniakal (Merck), lempeng silika gel GF254 (Merck), aseton *p.a* (Mallinckrodt), etanol *p.a* (Merck), n-heksan *p.a* (Merck), etanol 96%, hidrokuinon murni (BPFI) dan asam retinoat murni (BPFI).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Penyiapan bahan

- a. Preparasi sampel uji asam retinoat (BPOM, 2011, dengan modifikasi)

Sampel krim pemutih dipersiapkan dengan ditimbang seksama sampel sejumlah 3 g lalu masukkan dalam gelas ukur dan tutup menggunakan alumunium foil. Dilarutkan dengan 10 mL metanol *p.a* kemudian dikocok hingga benar-benar tercampur, lalu dilakukan

ultrasonikasi selama 5 menit kemudian dibiarkan dingin dalam waktu 15 menit menggunakan es. Setelah dingin, disaring dengan kertas saring *Whatman* No.41.

b. Preparasi sampel uji hidrokuinon (Yulia, 2020, dengan modifikasi)

Sampel krim pemutih dipersiapkan dengan ditimbang seksama sampel sejumlah 0,1 g lalu dilarutkan menggunakan etanol 96% sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan dalam gelas ukur kapasitas 100 mL dan ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas. Selanjutnya, dikocok larutan hingga homogen lalu dilakukan ultrasonikasi selama 5 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring.

2. Uji kualitatif dan kuantitatif sampel

a. Uji kualitatif asam retinoat (BPOM, 2011, dengan modifikasi)

Pengujian kualitatif asam retinoat dengan metode yang digunakan KLT. Terlebih dahulu dibuat larutan pengembang dengan cara dimasukkan larutan berupa n-heksan - aseton dengan perbandingan (6:4) v/v dalam *chamber*. Selanjutnya ditutup *chamber* menggunakan lempeng kaca dan diamankan sampai eluen menjadi jenuh. Diaktifkan lempeng KLT yang akan digunakan dengan pemanasan menggunakan oven di suhu 105°C dalam waktu 30 menit. Setelah diaktifkan lempeng dibiarkan dingin terlebih dahulu, lalu dibuat batas penotolan serta batas elusi sebesar 10 cm pada lempeng KLT. Digunakan pipa kapiler untuk menotolkan larutan pembanding serta larutan uji secara terpisah dengan jarak 1 cm dari dasar lempeng dengan jarak total 1 cm lalu dibiarkan mengering selama beberapa saat. Dilakukan penjenuhan menggunakan fase gerak pada *chamber* KLT, lalu dimasukkan lempeng KLT yang sudah terdapat cuplikan. Cara penjenuhan yaitu dengan dimasukkan kertas saring ke dalam eluen dalam waktu 30 menit. Dimasukkan lempeng KLT yang telah melalui tahap penotolan tersebut pada *chamber* yang terisi eluen hingga pelarut naik ke atas garis yang

telah ditentukan pada lempeng KLT. Kemudian lempeng diangkat dari *chamber* dan dibiarkan kering diudara. Dilakukan pengamatan dengan sinar UV pada λ 254 nm, jika berfluoresensi menimbulkan noda gelap maka menunjukkan terdapatnya kandungan asam retinoat.

b. Uji kuantitatif asam retinoat (Suhartini dkk, 2013, dengan modifikasi)

1) Pembuatan larutan baku asam retinoat

Ditimbang seksama asam retinoat murni sejumlah 0,1 g lalu dimasukkan ke dalam gelas ukur kemudian larutkan menggunakan metanol *p.a* sejumlah 100 mL sampai tanda batas. Selanjutnya, dikocok larutan sampai benar-benar tercampur untuk memperoleh konsentrasi baku asam retinoat 1000 ppm. Dipipet sejumlah 25 mL pada larutan baku 1000 ppm dan masukkan dalam labu ukur 50 mL. Ditambahkan sampai tanda batas metanol kemudian dikocok hingga benar-benar tercampur untuk memperoleh larutan asam retinoat konsentrasi 500 ppm.

2) Penentuan λ maksimum

Dipipet sejumlah 3 mL dari larutan asam retinoat konsentrasi 500 ppm lalu dimasukkan ke dalam gelas ukur 50 mL (konsentrasi 30 ppm). Selanjutnya, ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas dan dilakukan homogenisasi untuk mengukur serapan maksimum menggunakan blanko (metanol) pada λ 200-400 nm.

3) Pembuatan kurva kalibrasi

Dipipet sejumlah 0,166; 0,333; 0,5; 0,666; 0,833 dan 1 mL larutan asam retinoat konsentrasi 30 ppm dalam gelas ukur 5 mL yang terpisah. Ditambahkan hingga tanda batas metanol *p.a*, lalu dikocok sampai benar-benar tercampur untuk mendapatkan larutan berkonsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 ppm. Setelah itu, diukur serapan maksimum menggunakan λ yang sudah diperoleh

sebelumnya menggunakan blanko (metanol). Dibuat kurva standar dengan cara memplotkan konsentrasi vs absorbansi.

4) Penentuan kadar asam retinoat pada sampel

Ditimbang seksama sejumlah 3 g tiap sampel lalu ditempatkan pada gelas ukur 50 mL kemudian dilapisi menggunakan aluminium foil. Setelah terlapisi, ditambahkan metanol *p.a* sejumlah 10 mL lalu dikocok agar homogen. Biarkan dingin selama 15 menit dalam es sebelum melakukan penyaringan melalui kertas saring *Whatman* No.41. Ditampung filtrat ke dalam gelas ukur 50 mL kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas lalu homogenisasi. Dipipet sejumlah 1 mL filtrat pengenceran dimasukkan dalam gelas ukur 10 mL lalu ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas kemudian homogenisasi. Setelah itu diukur pada λ maksimum yang sudah ditentukan sebelumnya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

c. Uji kualitatif hidrokuinon

1) Reagen FeCl_3 (Rasyid dkk, 2015)

Ditimbang seksama seluruh sampel sejumlah 0,1 g lalu dilarutkan menggunakan etanol *p.a* sejumlah 5 mL dan ditambahkan 4 tetes FeCl_3 . Kandungan hidrokuinon ditunjukkan dengan terbentuknya endapan kuning.

2) Reagen Ag-ammoniakal (Rasyid dkk, 2015)

Ditimbang seksama seluruh sampel sejumlah 0,1 g lalu dilarutkan menggunakan etanol *p.a* sejumlah 5 mL. Setelah larut, ditambahkan Ag-ammoniakal sebanyak 3 tetes kemudian dipanaskan hingga muncul gelembung dan ditambahkan NaOH sebanyak 3 tetes. Kandungan hidrokuinon ditunjukkan jika menghasilkan warna cermin perak.

3) Metode kromatografi lapis tipis (FDA, 2017, dengan modifikasi)

Ukuran dalam mempersiapkan lempeng KLT adalah 10 x 5 cm. Digunakan n-heksan : aseton untuk membuat larutan eluen dengan perbandingan 3:2 lalu diletakkan di dalam *chamber* dan ditutup rapat agar tidak terjadi penguapan. Dimasukkan kertas saring dalam yang berisi eluen tersebut untuk menjenuhkannya dan dibiarkan meresap selama 30 menit. Ditimbang seksama sampel sejumlah 0,1 g lalu dilarutkan menggunakan etanol 96% sejumlah 5 mL serta larutan hidrokuinon pembeding sejumlah 0,1 g untuk selanjutnya dilarutkan menggunakan sejumlah 8 mL etanol 96%. Dilakukan penotolan sampel terlarut terhadap pembeding pada lempeng KLT menggunakan pipa kapiler dengan runcing khas di bagian ujung yang memiliki skala 1 μ L serta volume 1 μ L. Ditotolkan menggunakan pensil pada batas garis yang sudah terbuat di bagian bawah serta atas dengan ukuran 1 cm dalam lempeng KLT. Dimasukkan lempeng silika gel tersebut pada *chamber* yang telah terisi eluen agar pelarut naik hingga menuju garis yang telah ditentukan. Diangkat lempeng KLT dari dalam *chamber* untuk dilihat bercak pada λ 254 nm menggunakan lampu UV.

d. Uji kuantitatif hidrokuinon (Yulia, 2020, dengan modifikasi)

1) Pembuatan larutan baku hidrokuinon

Ditimbang seksama hidrokuinon murni sejumlah 0,1 g kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96% sejumlah 5 mL. Setelah larut, dipindahkan ke dalam gelas ukur 100 mL lalu ditambahkan etanol 96% sampai 100 mL tepat. Dikocok hingga benar-benar tercampur untuk memperoleh konsentrasi hidrokuinon baku 1000 ppm. Dipipet sejumlah 10 mL larutan baku 1000 ppm lalu dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL kemudian ditambahkan larutan etanol 96% sampai garis batas

lalu homogenisasi dengan pengocokan untuk menghasilkan konsentrasi larutan hidrokuinon 100 ppm.

2) Penentuan λ maksimum

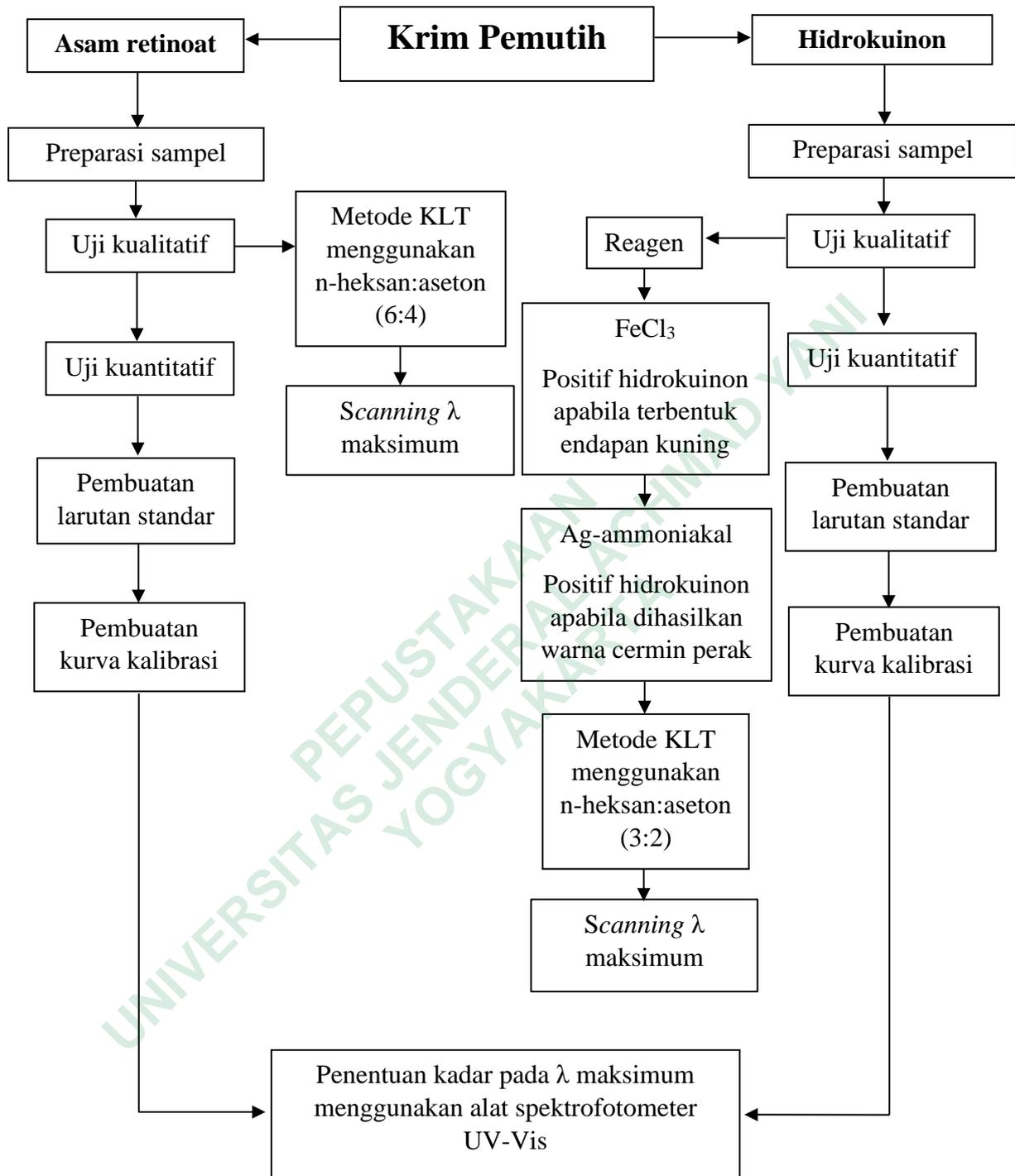
Dipipet larutan baku sejumlah 2,8 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian diencerkan menggunakan larutan etanol 96% hingga garis batas. Dikocok larutan agar homogen yang kemudian diukur melalui λ 250-350 nm.

3) Pembuatan kurva kalibrasi

Dipipet sejumlah 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; dan 4 mL larutan baku 100 ppm ke dalam labu ukur 10 mL yang terpisah. Ditambahkan larutan etanol 96% hingga garis batas, kemudian dikocok sampai benar-benar tercampur untuk mendapatkan konsentrasi larutan 15, 20, 25, 30, 35 dan 40 ppm. Selanjutnya, diukur serapan maksimum pada λ yang sudah diperoleh sebelumnya menggunakan blanko (etanol 96%). Dibuat kurva standar dengan cara memplotkan konsentrasi vs absorbansi.

4) Penentuan kadar hidrokuinon dalam sampel

Ditimbang seksama setiap sampel sejumlah 0,1 g lalu diencerkan menggunakan etanol 96% dalam labu ukur 100 mL untuk selanjutnya disaring melalui kertas saring *Whatman* No.41. Dipipet sejumlah 3 mL ke dalam gelas ukur 10 mL untuk memperoleh konsentrasi 300 ppm lalu disaring ulang melalui kertas saring *Whatman* No.41. Diukur setiap sampel pada λ maksimum memakai instrumen spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 5. Skema penelitian

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan Rf

Perhitungan nilai Rf pada senyawa asam retinoat dan hidrokuinon menggunakan metode KLT secara kualitatif terhadap senyawa pembanding baku asam retinoat dan hidrokuinon. Nilai Rf dihitung menggunakan rumus:

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

2. Perhitungan kadar asam retinoat dan hidrokuinon

Kadar senyawa asam retinoat dan hidrokuinon dihitung dengan persamaan regresi linear yang menerangkan keterkaitan antara kadar (x) dengan absorbansi (y) sebagai $y = bx + a$. Hasil kadar asam retinoat dan hidrokuinon dari masing-masing sampel yang sudah didapat selanjutnya dihitung parameter berupa rata-rata, *standard deviation* (SD), *coefficient of variation* (CV) serta *standard error of mean* (SEM) dimana hasil akhir kadar dinyatakan dalam kadar \pm SEM.