

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif dan observasional untuk mengetahui kandungan hidrokuinon pada krim pemutih yang dijualbelikan di *E-commerce X*. Analisis sampel dilakukan secara kualitatif menggunakan  $\text{FeCl}_3$  dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) kemudian dilanjutkan dengan metode densitometri untuk uji kuantitatif.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Mei 2025.

#### **C. Sampel Penelitian**

Penelitian ini dilakukan menggunakan sampel krim pemutih wajah tanpa label BPOM dan ada label BPOM tetapi tidak ada di halaman *web* yang dijualbelikan di *E-commerce X*. Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*, dengan kata kunci krim pemutih wajah *glowing* cepat kemudian sampel dipilih berdasarkan pada kriteria tertentu yang ditetapkan sebagai berikut:

##### 1. Kriteria inklusi

- a. Krim pemutih wajah yang diperoleh dari media *E-commerce X*
- b. Krim pemutih wajah tanpa label BPOM dan ada label BPOM tetapi tidak ada di halaman *web*
- c. Krim pemutih wajah diklaim dapat memutihkan lebih cepat
- d. Krim pemutih wajah dengan kisaran harga mulai dari Rp15.000 – Rp50.000
- e. Krim pemutih wajah yang memiliki *rating* di atas 4

## 2. Kriteria eksklusi

- a. Krim pemutih wajah yang telah melalui kadaluarsa
- b. Krim pemutih wajah yang terdapat label BOPM dan ada di halaman *web*
- c. Krim pemutih wajah yang tidak dijualbelikan di media *E-commerce X*
- d. Krim pemutih wajah yang tidak memiliki bentuk utuh atau tidak layak pakai

Berdasarkan kriteria tersebut diperoleh total populasi sebanyak 31 sampel.

Untuk menghitung jumlah sampel dengan menggunakan rumus  $\sqrt{N} + 1$ , maka akan diperoleh 7 sampel yang akan dianalisis.

## D. Variabel Penelitian

### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah krim pemutih wajah yang dijualbelikan di *E-commerce X*.

### 2. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini berupa pelarut etanol 96%, suhu pelarutan sampel 60°C, dan volume penotolan 10  $\mu$ L.

### 3. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai Rf dan kandungan hidrokuinon pada krim pemutih.

## E. Definisi Operasional

1. Krim pemutih wajah tanpa label BPOM dan ada label BPOM tetapi tidak ada di halaman *web* yang dijualbelikan di *E-commerce* akan menjadi sampel pada penelitian ini untuk mengidentifikasi kandungan hidrokuinon.
2. Proses preparasi dilakukan pada sampel, kemudian dilarutkan dalam etanol 96% untuk digunakan uji kualitatif berupa KLT dan uji kuantitatif dengan densitometri.
3. Kandungan hidrokuinon dinyatakan dalam satuan % b/b.

## F. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Set alat gelas (*Iwaki*), *chamber* 10x10 (*Camag*), *chamber* (*Duran*) 25x25, densitometer (*Camag TLC Scanner 4*), *drop plate*, lampu UV, mikropipet (*Ohaus*), oven (*Memmert*), timbangan analitik (*Ohaus*), dan *waterbath* (*Memmert*).

### 2. Bahan

Asam asetat glasial, etanol 96%, etanol *p.a* (*SMART-LAB*),  $\text{FeCl}_3$ , HCl 4 N, hidrokuinon (BPFI), kertas saring, krim pemutih wajah tanpa label BPOM dan label BPOM tetapi tidak terdaftar pada laman *web* yang dijualbelikan di *e-commerce* X, natrium sulfat, pipa kapiler, silika gel F254 (*Merck*), dan toluen (*Malinckrodt*).

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Analisis Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan mencakup pengujian bentuk, aroma, warna, dan tekstur (Tandiseru & Wahidin, 2024).

### 2. Preparasi Standar dan Sampel

#### a. Preparasi sampel

Ditimbang sebanyak 1,25 gram sampel krim pemutih, dimasukkan ke dalam gelas *beaker*, kemudian ditambahkan 3 tetes HCl 4 N dan 5 mL etanol *p.a*, lalu campuran tersebut dipanaskan ke dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 10 menit sambil diaduk (Siddique *et al.*, 2012). Setelah proses pemanasan, sampel disaring menggunakan kertas saring yang telah diberi natrium sulfat untuk menghilangkan lemak. Filtrat hasil penyaringan ditempatkan ke dalam labu ukur berkapasitas 25,0 mL, dan ditambahkan etanol *p.a* hingga mencapai tanda batas, selanjutnya dihomogenkan dengan cara digojog (Harimurti *et al.*, 2021). Dari larutan sampel 25 mL diambil 1,0 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL kemudian ditambahkan etanol *p.a* hingga volume mencapai tanda batas dan dihomogenkan. Larutan ini digunakan sebagai larutan sampel untuk analisis KLT dan densitometri.

b. Pembuatan larutan standar hidrokuinon

Ditimbang 25,0 mg hidrokuinon BPF1, kemudian larutan dibuat dengan menambahkan 5 mL etanol 96%. Selanjutnya, dipindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 5,0 mL dan ditambahkan etanol 96% hingga mencapai tanda batas. Digojok larutan sampai larut sehingga akan dihasilkan larutan baku hidrokuinon pada konsentrasi 5000 ppm. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 50, 100, 150, 150, dan 250 ppm dari konsentrasi 5000 ppm sebanyak 10,0 mL.

3. Analisis Kualitatif

a. Pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%

Sampel krim pemutih yang sudah dilakukan preparasi diteteskan di atas *drop plate* sebanyak 5 tetes, kemudian ditambahkan 5 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Sampel yang positif mengandung hidrokuinon ditunjukkan dengan perubahan warna hijau kekuningan hingga kehitaman (Chakti *et al.*, 2019)

b. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1) Optimasi Fase gerak

Larutan standar hidrokuinon serta larutan sampel krim pemutih wajah yang telah dipreparasi, selanjutnya dilakukan uji coba terhadap beberapa kombinasi fase gerak, yaitu n-heksan:aseton (8:2), kloroform:metanol (3:2), dan toluen:asam asetat glasial (4:1). Larutan standar dan sampel ditotolkan sebanyak 10  $\mu\text{L}$  pada plat KLT silika gel F254, kemudian dielusi dalam *chamber* yang telah dijenuhkan dengan fase gerak selama kurang lebih 15 menit. Setelah elusi selesai, plat diamati di bawah sinar UV 254 nm untuk melihat posisi spot. Suatu fase gerak dikatakan optimal apabila mampu memberikan pemisahan bercak yang jelas, tidak menyatu, serta memiliki nilai Rf yang terpisah secara signifikan antara senyawa hidrokuinon dan pengotor (Suharyani *et al.*, 2021).

2) Penjenuhan *chamber*

Penjenuhan *chamber* dilakukan dengan cara memasukkan toluen sebanyak 8 mL dan asam asetat glasial 2 mL ke dalam *chamber* 10 x 10

cm. Kertas saring diletakkan ke dalamnya untuk mengetahui bahwa *chamber* sudah jenuh. Penjenuhan berlangsung selama 30 menit, atau penjenuhan dapat dipastikan ketika kertas saring terbasahi oleh eluen (Harimurti *et al.*, 2021).

3) Penotolan larutan baku dan sampel krim pemutih

Penotolan larutan baku dan sampel dilakukan pada plat silika gel F254 dengan ukuran  $10 \times 10$  cm. Pada bagian bawah plat, diberi tanda 1 cm, di mana garis tersebut merupakan titik awal tempat sampel ditotolkan. Selanjutnya sepanjang 8 cm di atas garis tersebut dibuat garis lainnya yang menjadi batas akhir yang menandakan bahwa proses pengembangan telah selesai. Setelah itu, ditotolkan sebanyak 10  $\mu$ L larutan baku dan sampel pada plat silika gel F254 (Conita & Arsito, 2018).

4) Proses elusi

Plat silika gel F254 yang sudah diberi totolan dimasukkan pada *chamber* yang telah dijenuhkan oleh fase gerak. Proses elusi dilakukan dalam keadaan tertutup rapat. Setelah eluen mencapai batas akhir, plat kemudian diambil dari *chamber* dan diangin-anginkan hingga kering. Selanjutnya, plat silika gel F254 yang sudah kering dideteksi dengan menggunakan sinar UV untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya bercak pada silika gel. Setelah itu, dilakukan penghitungan nilai *Retardation Factor* (Rf) berdasarkan jarak yang dilalui oleh sampel dibandingkan dengan jarak yang dilalui oleh eluen (Conita & Arsito, 2018).

4. Analisis Kuantitatif KLT-Densitometri

a. Proses KLT

Proses KLT pada analisis kuantitatif seperti halnya dengan analisis kualitatif, namun terdapat beberapa modifikasi.

1) Penjenuhan *chamber*

Penjenuhan *chamber* dilakukan dengan cara memasukkan toluen sebanyak 120 mL dan asam asetat glasial 30 mL ke dalam *chamber* 25

x 25 cm. Kertas saring diletakkan ke dalamnya untuk mengetahui bahwa *chamber* sudah jenuh. Penjenuhan berlangsung selama 90 menit, atau penjenuhan dapat dipastikan ketika kertas saring terbasahi oleh eluen.

2) Penotolan larutan baku dan sampel krim pemutih

Penotolan larutan baku dan sampel dilakukan pada plat silika gel F254 dengan ukuran  $20 \times 20$  cm. Pada bagian bawah plat, diberi tanda 1 cm, di mana garis tersebut merupakan titik awal tempat sampel ditotolkan. Selanjutnya sepanjang 18 cm di atas garis tersebut dibuat garis lainnya yang menjadi batas akhir yang menandakan bahwa proses pengembangan telah selesai. Setelah itu, ditotolkan sebanyak  $10 \mu\text{L}$  larutan baku dan pada masing-masing sampel dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada plat silika gel F254.

3) Proses elusi

Plat silika gel F254 yang sudah diberi totolan dimasukkan pada *chamber* yang telah dijenuhkan oleh fase gerak. Proses elusi dilakukan dalam keadaan tertutup rapat. Setelah eluen mencapai batas akhir, plat kemudian diambil dari *chamber* dan diangin-anginkan hingga kering. Selanjutnya, plat silika gel F254 yang sudah kering dideteksi dengan menggunakan sinar UV untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya bercak pada silika gel. Setelah itu dilanjutkan untuk analisis kuantitatif dengan densitometri.

b. Proses densitometri

1) Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan standar hidrokuinon dengan konsentrasi 5000 ppm diambil sebanyak  $300 \mu\text{L}$  menggunakan mikropipet, kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10,0 mL. Selanjutnya ditambahkan dengan etanol 96% hingga mencapai tanda batas. Pada proses ini, diperoleh larutan dengan konsentrasi akhir 150 ppm. Larutan tersebut kemudian dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 250-400 nm.

## 2) Pembuatan kurva baku

Larutan standar hidrokuinon 5000 ppm diambil sebanyak 100; 200; 300; 400; dan 500  $\mu$ L menggunakan mikropipet, lalu dituangkan pada labu ukur berkapasitas 10,0 mL. Setelah itu ditambahkan etanol 96% hingga tanda batas dan diperoleh konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250 ppm. Masing konsentrasi tersebut ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler dan dimasukkan ke dalam chamber berisi fase gerak toluen : asam asetat glasial (4:1), kemudian ditunggu sampai tanda batas atas plat KLT dan dilihat bercak yang terbentuk pada sinar UV 254 nm.

## 3) Penetapan kadar sampel krim pemutih

Plat KLT yang sudah diamati bercak dengan sinar UV, kemudian dimasukkan ke dalam alat pembaca densitometer untuk mengetahui kadar hidrokuinon pada krim pemutih wajah. *Scan* bercak dapat diamati pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh. Jumlah kandungan hidrokuinon dalam sampel dihitung berdasarkan hubungan antara *Area Under Curve* (AUC) vs konsentrasi (Harimurti *et al.*, 2021).

## H. Analisis Data

Berikut merupakan prosedur analisis data yang dilakukan:

### 1. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Untuk mengidentifikasi hidrokuinon dalam krim pemutih, dilakukan perhitungan nilai  $R_f$ . Dalam analisis ini, senyawa pembanding baku hidrokuinon digunakan untuk membandingkan hasil elusi pada sampel. Nilai  $R_f$  yang diperoleh dari sampel krim pemutih dibandingkan dengan nilai  $R_f$  dari baku pembanding hidrokuinon untuk memastikan ada atau tidaknya kandungan hidrokuinon dalam sampel (Harimurti *et al.*, 2021). Rumus perhitungan  $R_f$  sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak ditempuh komponen}}{\text{Jarak ditempuh eluen}}$$

## 2. Analisis Densitometri

- a. Perhitungan nilai kandungan hidrokuinon pada sampel dihitung menggunakan hubungan antara konsentrasi vs nilai *Area Under Curve* (AUC), sehingga akan diperoleh persamaan regresi sebagai berikut: (Lestari & Prasasti, 2018).

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = AUC

x = Konsentrasi

a = *Slope*

b = Intersep

Setelah diperoleh persamaan regresi linier dari kurva baku, langkah berikutnya adalah menghitung kadar hidrokuinon dalam sampel. Hal ini dilakukan dengan memasukkan nilai AUC sampel ke dalam persamaan regresi linear, dimana y adalah nilai AUC dan x merupakan konsentrasi hidrokuinon dalam sampel. Hasil nilai x yang didapatkan kemudian digunakan untuk menghitung % dari kadar hidrokuinon dalam sampel berdasarkan berat totalnya menggunakan rumus yang telah ditetapkan sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar} = \frac{\text{Konsentrasi (C)} \times \text{Volume(V)}}{\text{Bobot sampel (W)}} \times F_p \times 100\%$$

Keterangan:

C = Konsentrasi sampel (mg/mL)

V = Volume sampel (mL)

Fp = Faktor pengenceran

W = Bobot sampel (mg)

- b. Nilai rata-rata

Nilai rata-rata adalah nilai yang menggambarkan keseluruhan data. Nilai rata-rata dihitung dengan menjumlahkan total data dibagi dengan banyak data (Putria *et al.*, 2015).

$$\bar{X} = \frac{\text{Jumlah seluruh data}}{\text{Banyak data}}$$

Keterangan:

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

c. Standar Devisiasi (SD)

Standar devisiasi adalah ukuran statistik yang menggambarkan seberapa besar variasi atau penyebaran data di sekitar nilai rata-rata (Herdini *et al.*, 2019).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{1-n}^n (xi-x)^2}{n-1}}$$

Keterangan:

SD = Standar devisiasi

$\sum_{1-n}^n$  = Notasi sigma, penjumlahan mulai dari 1 hingga n

xi = Nilai varians

x = Nilai dari masing-masing pengukuran

n-1 = Jumlah data

d. *Coefficient Variation* (CV)

Koefisien variasi adalah nilai yang menunjukkan bagaimana nilai standar devisiasi bandingkan dengan nilai rata-rata (Thamrin, 2020).

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan:

CV = Koefisien variasi

SD = Standar devisiasi

$\bar{X}$  = Rata-rata perhitungan

e. *Limit of Error* (LE)

*Limit of error* adalah perkiraan nilai yang mencakup nilai populasi sebenarnya (Hazra, 2017).

$$LE = t \text{ tabel} \times \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Keterangan:

LE = *Limit of Error*

T tabel = Nilai t kritis diambil dari tabel distribusi *t-student*

SD = Devisiasi standar  
n = Akar kuadrat dari jumlah sampe

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI  
PEPUSTAKAAN  
YOGYAKARTA