

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Studi ini menggunakan metode observasional dengan analisis deskriptif, penelitian ini meneliti kandungan asam salisilat sebagai senyawa aktif dalam 7 sampel dari krim anti-jerawat yang diperoleh dari klinik kecantikan di Kabupaten Sleman Yogyakarta.

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

1. Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Juni tahun 2025

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

Tujuh sampel krim anti-jerawat berbagai merek (sampel A, B, C, D, E, F dan G) dipilih dari tujuh klinik kecantikan di daerah Sleman, Yogyakarta untuk dijadikan sampel penelitian. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *purposive sampling* untuk memastikan data yang diperoleh memenuhi kriteria penelitian. Sampel dalam studi ini ditetapkan sesuai dengan pedoman kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria tersebut berfungsi untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan sesuai dengan tujuan penelitian. Oleh karena itu, analisis hanya akan menggunakan sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi persyaratan eksklusi.

1. Kriteria inklusi

- a. Krim anti-jerawat yang dijual di klinik kecantikan kabupaten Sleman Yogyakarta
- b. Krim anti-jerawat yang bukan racikan dokter
- c. Klinik kecantikan yang memiliki rating tinggi (4,8 – 5,0) berdasarkan ulasan di google maps

2. Kriteria eksklusi
  - a. Krim anti-jerawat yang berasal dari satu klinik kecantikan yang sama
  - b. Krim anti-jerawat yang melebihi tanggal kadaluwarsa
  - c. Krim anti-jerawat yang kemasannya rusak

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah tempat pengambilan sampel (klinik kecantikan)

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar asam salisilat dalam sediaan krim anti-jerawat.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah fase gerak, volume serta konsentrasi larutan baku, suhu aktivasi lempeng plat KLT, dan volume penotolan.

#### **E. Definisi Operasional**

1. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 7 produk (A, B, C, D, E, F dan G) krim anti-jerawat yang diperoleh dari tujuh klinik kecantikan di Kabupaten Sleman Yogyakarta yang sesuai dengan kriteria inklusi.
2. Analisis kualitatif dan kuantitatif digunakan untuk memeriksa setiap sampel. Analisis kualitatif asam salisilat direaksikan dengan penambahan  $\text{FeCl}_3$  1%. Untuk analisis kuantitatif asam salisilat dilakukan dengan menggunakan metode KLT-Densitometri.
3. Hasil analisis kuantitatif dengan metode KLT-Densitometri dinyatakan dalam persen kadar sesungguhnya ( $\%^{b/b}$ ).

## F. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Beberapa alat yang akan dipakai dalam analisis asam salisilat dalam sediaan krim anti-jerawat antara lain: batang pengaduk, cawan porselen (*Pyrex*), densitometer (CAMAG-TLC scanner 4), erlenmeyer, gelas beker (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), kaca arloji, labu takar (*Pyrex*), mikropipet (*Ependorf*), neraca analitik (*Ohaus*), pipet ukur (*Pyrex*), rak tabung, sendok tanduk, tabung reaksi (*Pyrex*).

### 2. Bahan

Sampel dalam penelitian ini adalah krim anti-jerawat yang di ambil dari klinik kecantikan di Yogyakarta, asam salisilat Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPFI), asam asetat glasial, *aquadest*, etanol *p.a*, besi III klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) 1%, silika gel 60 F<sub>254</sub>, toluen *p.a*.

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Preparasi Sampel

Ketujuh sampel krim anti-jerawat yang didapat dari klinik kecantikan yang ada di Kabupaten Sleman Yogyakarta ditimbang seksama sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker lalu tambahkan dengan 10 mL etanol *p.a* kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit. Selanjutnya ditutup menggunakan aluminium foil dan ditunggu selama 1 menit dalam suhu ruang kemudian didinginkan dalam kulkas selama 15 menit, saring menggunakan kertas saring. Dimasukkan filtratnya ke dalam labu ukur 10 mL lalu tambahkan etanol *p.a* hingga tanda batas.

### 2. Uji Warna

Larutan sampel yang telah dilarutkan dan larutan asam salisilat BPFI diambil sebanyak 1 mL, masukan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Asam salisilat BPFI digunakan sebagai kontrol positif. Amati perubahan warna yang terjadi, sampel dinyatakan positif mengandung asam salisilat apabila terbentuk larutan berwarna ungu kebiruan yang sama dengan warna kontrol positif.

### 3. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

#### a. Pembuatan Fase Gerak

Dicampurkan toluen dengan asam asetat glasial dengan perbandingan (4:1) dalam jumlah 15 mL ke dalam *chamber*. Masukkan kertas saring pada fase gerak kemudian tutup dengan plat kaca dan biarkan kertas saring terbasahi seluruhnya yang menandai bahwa fase gerak tersebut sudah jenuh.

#### b. Pembuatan dan Pengaktifan Fase Diam

Disiapkan fase diam berupa plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> berukuran 20 x 20 cm, 10 x 10 cm, dan 10 x 5 cm. Dibuat tanda batas atas dan bawah 1 cm. Sebelum dilakukan penotolan larutan, plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit.

#### c. Pembuatan Larutan Baku

Ditimbang serbuk asam salisilat BPF1 secara seksama sebanyak 50 mg, kemudian tambahkan etanol *p.a* lalu aduk hingga homogen. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan tambahkan etanol *p.a* hingga tanda batas, kemudian larutan dikocok hingga homogen. Didapatkan konsentrasi larutan baku asam salisilat sebesar 5000 ppm dalam etanol *p.a*.

Diambil larutan baku 5000 ppm sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, dan 1 mL. Dimasukkan masing-masing ke dalam labu ukur 5 mL lalu tambahkan etanol *p.a* sampai tanda batas kemudian dikocok hingga homogen. Didapatkan larutan dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm.

#### d. Optimasi

##### 1) Preparasi Larutan Adisi

Satu sampel krim anti-jerawat yang didapat dari klinik kecantikan yang ada di Kabupaten Sleman Yogyakarta ditimbang seksama sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker lalu tambahkan dengan 10 mL etanol *p.a* aduk hingga homogen. Selanjutnya, tambahkan larutan baku asam salisilat dengan konsentrasi 1000 ppm sebanyak 2 mL kemudian

panaskan di atas penangas air selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan dalam kulkas selama 15 menit lalu saring menggunakan kertas saring. Filtrat yang telah didapatkan kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan di tambahkan etanol *p.a* hingga tanda batas.

## 2) Optimasi Metode Ekstraksi

Ditotolkan larutan sampel dan larutan adisi (campuran larutan sampel dan larutan baku asam salisilat) pada plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 5 cm menggunakan pipa kapiler sebanyak 3 µL dan diberi jarak antar penotolan. Diamkan plat KLT hingga totolan kering pada suhu ruang. Selanjutnya, plat dimasukan ke dalam *chamber* yang telah dikembangkan dengan fase gerak kemudian ditutup rapat dan diamkan plat KLT dalam *chamber* hingga fase gerak naik dan plat KLT terelusi secara maksimal sampai batas atas lalu angkat dan kering anginkan. Bercak noda yang timbul pada plat KLT selanjutnya dilihat di bawah sinar UV 254 nm. Hasil optimasi yang baik ditunjukkan dengan munculnya bercak asam salisilat yang terpisah serta terlihat dengan jelas saat dibandingkan dengan bercak larutan asam salisilat BPHI.

## 3) Optimasi Pemisahan Pada KLT

Ditotolkan ketiga larutan yaitu larutan asam salisilat BPHI, larutan sampel dan larutan adisi (campuran larutan sampel dan larutan baku asam salisilat) pada plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 5 cm menggunakan pipa kapiler sebanyak 3 µL dan diberi jarak antar penotolan. Diamkan plat KLT hingga totolan kering pada suhu ruang. Selanjutnya, plat dimasukan ke dalam *chamber* yang telah dikembangkan dengan fase gerak kemudian ditutup rapat dan diamkan plat KLT dalam *chamber* hingga fase gerak naik dan plat KLT terelusi secara maksimal sampai batas atas lalu angkat dan kering anginkan. Bercak noda yang timbul pada plat KLT selanjutnya dilihat di bawah sinar UV 254 nm. Hasil optimasi yang baik ditunjukkan dengan tidak adanya tailing yang terjadi pada pemisahan bercak

dari ketiga larutan. Hal ini mendasari pemisahan tahapan KLT yang akan dilakukan selanjutnya.

e. Uji Kuantitatif KLT-Densitometri

1) Penetapan Kromatografi Lapis Tipis

a) Uji Kualitatif KLT

Ditotolkan larutan sampel dan larutan baku yang telah dipersiapkan sebelumnya pada plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 10 cm yang telah diaktifkan. Larutan uji ditotolkan secara berurutan menggunakan pipa kapiler dengan volume penotolan sebanyak 10  $\mu$ L dan diberi jarak antar penotolan. Plat KLT yang telah mengandung cuplikan di diamkan hingga totolan kering pada suhu ruang.

Plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah dikembangkan dengan fase gerak kemudian ditutup rapat dan diamkan plat KLT dalam *chamber* hingga fase gerak naik dan plat KLT terelusi secara maksimal sampai batas atas lalu angkat dan kering anginkan. Bercak noda yang timbul pada plat KLT selanjutnya dilihat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm, kemudian hitung nilai  $R_f$  pada setiap sampel dengan cara membandingkan nilai  $R_f$  sampel dan nilai  $R_f$  larutan baku (Rahman, 2008 dengan modifikasi).

b) Uji Kuantitatif KLT

Ditotolkan larutan sampel positif mengandung asam salisilat berdasarkan hasil uji KLT kualitatif dan larutan baku yang telah dipersiapkan sebelumnya pada plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan ukuran 20 x 20 cm yang telah diaktifkan. Larutan uji ditotolkan secara berurutan menggunakan pipa kapiler dengan volume penotolan sebanyak 15  $\mu$ L dan diberi jarak antar penotolan. Plat KLT yang telah mengandung cuplikan didiamkan hingga totolan kering pada suhu ruang.

Plat KLT dimasukan ke dalam *chamber* yang telah dijenuhkan dengan campuran fase gerak toluen dan asam asetat glasial (4:1) dengan volume 150 mL kemudian ditutup rapat dan diamkan plat KLT dalam *chamber* hingga fase gerak naik dan plat KLT terelusi secara maksimal sampai batas atas lalu angkat dan kering anginkan. Bercak noda yang timbul pada plat KLT selanjutnya dilihat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. Hasil bercak yang muncul pada plat KLT selanjutnya dilakukan pembacaan pada alat densitometer (Rahman, 2008 dengan modifikasi).

## 2) Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Plat KLT yang telah terelusi selanjutnya dilakukan *scanning* pada rentang panjang gelombang 250 nm sampai 350 nm menggunakan alat densitometer (CAMAG-TLC *scanner* 4) (Rahman, 2008 dengan modifikasi).

## 3) Penetapan Kadar dengan Densitometri

Plat KLT yang telah dilihat di bawah sinar ultraviolet dan mengandung sampel asam salisilat selanjutnya di tempatkan pada alat densitometer (CAMAG-TLC *scanner* 4) untuk mengetahui kadar asam salisilat dalam sampel krim anti-jerawat. Analisis dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang yang telah diperoleh. Luas area di bawah kurva (AUC) yang dihasilkan digunakan sebagai acuan untuk menghitung kadar asam salisilat pada sampel (Rahman, 2008 dengan modifikasi).

## H. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini yaitu:

### 1. Nilai $R_f$

Rumus perhitungan nilai  $R_f$  dari senyawa asam salisilat yang dianalisis secara kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan senyawa pembanding standar asam salisilat.

$$R_F = \frac{\text{Jarak yang di tempuh oleh senyawa (cm)}}{\text{Jarak yang di tempuh oleh pelarut (cm)}} \dots\dots\dots(1)$$

## 2. Analisis Penetapan Kadar Asam Salisilat

Hasil *scanning* dari baku dan sampel ditampilkan dalam nilai AUC (*Area Under Curve*). Kadar diperoleh dengan memasukan nilai AUC sampel dalam regresi linier antara konsentrasi baku (X) dengan AUC baku (Y), sehingga diperoleh persamaan  $y = bx + a$ . Dimasukkan nilai AUC sampel sebagai (Y), sehingga diperoleh kadar sampel (x) dengan satuan konsentrasi ppm. Kadar dikonversi menjadi satuan mg/mL, untuk dimasukkan ke dalam rumus % kadar.

Dihitung nilai kadar sesungguhnya menggunakan rumus:

$$\% \text{ kadar} = \frac{C \times V \times FP}{W} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

C = Konsentrasi sampel (x) (mg/mL)

V = Volume larutan sampel (mL)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (mg) (Lestari & Prasasti, 2018).

## 3. Analisis Data

Setelah didapatkan hasil kadar asam salisilat pada setiap sampel, selanjutnya adalah menghitung parameter seperti rata-rata, standar deviasi (SD), koefisien variasi (CV), dan nilai *limit of error* (LE)