

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini ialah penelitian non-eksperimental yang bersifat deskriptif karena hanya memberi gambaran berupa kadar hidrokuinon didalam krim pemutih yang beredar di klinik kecantikan Kota Yogyakarta. Krim pemutih diidentifikasi secara kualitatif menggunakan  $\text{FeCl}_3$  1% dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilanjutkan analisis kuantitatif dengan metode densitometri.

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

##### 1. Lokasi Penelitian

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

##### 2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan April – Mei 2025

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

Metode pengambilan sampel didalam studi ialah menggunakan teknik *purposive sampling*, yakni salah satu metode pemilihan sampel yang didasarkan pada pertimbangan serta kriteria tertentu, seperti:

##### 1. Kriteria inklusi

Krim pemutih yang beredar di klinik kecantikan Kota Yogyakarta tanpa label BPOM dan label BPOM yang ada maupun tidak ada dihalam *web*, dengan rentang harga Rp60.000 – Rp100.000, dalam produk tercantumkan tanpa ED maupun dengan ED.

##### 2. Kriteria eksklusi

Wadah krim yang diterima dalam kondisi rusak dan rating penjualan di bawah 4,8.

Berdasarkan hasil survei, terdapat 20 klinik kecantikan di Kota Yogyakarta. Namun, produk dari klinik tersebut tidak dapat dibeli secara langsung karena pembelian hanya diperbolehkan bagi pelanggan yang menjalani perawatan terlebih dahulu. Oleh karena itu, untuk mengatasi keterbatasan ini dilakukan pembelian melalui metode *online* melalui *E-commerce*. Dari 20 klinik tersebut terdapat 6 klinik yang menyediakan layanan pembelian secara *online*. Sementara sisanya tetap mengharuskan pelanggan menjalani perawatan sebelum dapat membeli produk. Oleh karena itu, pengambilan sampel dilakukan pada 6 klinik tersebut dengan setiap klinik diwakili 1 sampel.

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

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas studi ialah krim pemutih yang dijualbelikan melalui *online* di klinik kecantikan Kota Yogyakarta.

##### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat studi ialah nilai  $R_f$  dan kadar hidrokuinon dalam krim pemutih.

##### 3. Variabel Terkendali

Jenis pelarut fase gerak toluen : asam asetat glasial (4:1), suhu pelarutan sampel 50 °C, aktivasi plat pada suhu 105°C selama 30 menit dan volume penotolan 10 µL.

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

Sampel krim pemutih yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari klinik kecantikan Kota Yogyakarta secara *online* dengan kriteria yang telah ditetapkan. Sampel dilakukan uji kualitatif menggunakan metode KLT dengan fase gerak toluen : asam asetat glasial (4:1). Setelah melakukan proses KLT, dilanjutkan analisis kuantitatif menggunakan densitometri. Konsentrasi hidrokuinon dalam sampel dinyatakan dalam satuan persen (% b/b).

## F. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat

Bejana kromatografi (*camag*) 10 x 10, bejana kromatografi (*Duran*) 25 x 25, cawan porselin, densitometer (*camag TLC Scanner 4*), *drop plate*, kaca preparat, lampu UV, mikropipet (*Ohaus*), oven (*memmert*), set alat gelas (*Iwaki*), mikropipet (*Ohaus*), timbangan analitik (*Ohaus*), serta *waterbath* (*memmert*).

### 2. Bahan

Asam asetat glasial *p.a*, *blue tip*, etanol 96%, HCl 4 N, kertas saring, natrium sulfat, pipa kapiler, sampel krim pemutih yang diperoleh dari klinik kecantikan di Kota Yogyakarta, *silica* gel F254, standar hidrokuinon (BPFI), serta toluen *p.a*.

## G. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Uji Organoleptis

Pada uji ini, krim pemutih dioleskan pada kaca preparat, kemudian diamati karakteristik fisik seperti tekstur, bau dan warna (Budianor *et al.*, 2022).

### 2. Analisis Kualitatif

#### a. Preparasi sampel uji

Sampel krim pemutih ditimbang 500,0 mg lalu dimasukkan ke dalam cawan porselin. Setelah itu, ditambahkan 3 tetes HCl 4 N dan 5 mL etanol *p.a*, lalu dicampur secara merata dan dipanaskan selama 10 menit pada penangas air bersuhu 50°C. Setelah sampel dipanaskan, masing-masing sampel disaring pada kertas saring yang sebelumnya telah ditambahkan natrium sulfat guna menghilangkan kandungan lemak, kemudian filtrat dimasukkan ke labu ukur berkapasitas 5,0 mL. Setelah itu, ditambahkan etanol *p.a* sampai garis tanda pada masing-masing sampel dan dihomogenkan dengan cara dikocok (Harimurti *et al.*, 2021).

#### b. Pereaksi warna FeCl<sub>3</sub> 1%

Sampel yang sudah dilakukan preparasi, selanjutnya diuji pereaksi warna FeCl<sub>3</sub> 1% dengan cara diambil 5 tetes sampel ke dalam *drop plat*, lalu

ditambahkan sebanyak 5 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Pada sampel yang positif mengandung hidrokuinon ditunjukkan dengan perubahan warna kuning kehijauan hingga kehitaman (Chakti *et al.*, 2019).

c. Pembuatan larutan induk hidrokuinon

Ditimbang 25,0 mg hidrokuinon BPFI secara seksama kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL. Selanjutnya, ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas, dan kemudian dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan induk hidrokuinon dengan konsentrasi 5000 ppm (Nasiroh *et al.*, 2024).

d. 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  $R_f$  yang terpisah secara signifikan antara senyawa hidrokuinon dan pengotor (Suharyani *et al.*, 2021).

e. Penjenuhan bejana kromatografi

Sebanyak 8 mL toluen diukur menggunakan pipet ukur, kemudian dimasukkan pada gelas *beaker*. Selanjutnya sebanyak 2 mL asam asetat glasial ditambahkan ke dalam gelas *beaker* yang berisi toluen. Setelah campuran tersebut homogen dimasukkan dalam bejana kromatografi *camag* berukuran 10 x 10. Kertas saring dimasukkan dalam bejana kromatografi untuk memastikan bejana kromatografi telah terjenuhi oleh fase gerak. Kejenuhan ditandai dengan naiknya fase gerak hingga mencapai bagian atas kertas saring (Harimurti *et al.*, 2021).

f. Identifikasi standar dan sampel krim pemutih

Plat KLT silika gel F254 berukuran 10 x 10 cm disiapkan terlebih dahulu, kemudian digaris dengan pensil jarak 1 cm dari sisi atas dan bawah, kemudian dilakukan proses aktivasi dengan memanaskan plat dalam oven pada temperatur 105°C selama 30 menit. Sampel serta larutan standar ditotolkan masing-masing 10 µL memakai pipa kapiler, kemudian dibiarkan mengering. Setelah itu, plat KLT dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sudah dalam kondisi jenuh. Setelah cuplikan terelusi sempurna, kemudian plat KLT diangkat dan dikeringkan. Noda hasil pemisahan diamati di bawah sinar UV 254 nm. Hasil identifikasi hidrokuinon dalam sampel dibandingkan nilai Rf sampel dengan nilai Rf standar (Harimurti *et al.*, 2021).

3. Analisis Kuantitatif

a. Penjenuhan bejana kromatografi

Sebanyak 120 mL toluen diukur menggunakan pipet ukur, kemudian dimasukkan pada gelas *beaker*. Selanjutnya sebanyak 30 mL asam asetat glasial ditambahkan ke dalam gelas *beaker* yang berisi toluen. Setelah campuran tersebut homogen dimasukkan dalam bejana kromatografi berukuran 25 x 25. Kertas saring dimasukkan dalam bejana kromatografi untuk memastikan bejana kromatografi telah terjenuhi oleh fase gerak. Kejenuhan ditandai dengan naiknya fase gerak hingga mencapai bagian atas kertas saring (Harimurti *et al.*, 2021).

b. Identifikasi standar dan sampel krim pemutih

Plat KLT silika gel F254 berukuran 20 x 20 cm disiapkan terlebih dahulu, kemudian digaris dengan pensil jarak 1 cm dari sisi atas dan bawah, kemudian dilakukan proses aktivasi dengan memanaskan plat dalam oven pada temperatur 105°C selama 30 menit. Selanjutnya, standar dan sampel yang positif hidrokuinon ditotolkan dengan volume 10 µL menggunakan pipa kapiler dan dibiarkan beberapa saat hingga mengering. Penotolan sampel dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Setelah itu, plat KLT dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sudah dalam kondisi jenuh. Setelah cuplikan terelusi sempurna, kemudian plat KLT diangkat dan dikeringkan. Noda hasil

pemisahan diamati di bawah sinar UV 254 nm. Hasil identifikasi hidrokuinon dalam sampel dibandingkan nilai Rf sampel dengan nilai Rf standar (Harimurti *et al.*, 2021).

c. Penetapan panjang gelombang maksimum

Larutan standar hidrokuinon konsentrasi 150 ppm diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 250-400 nm untuk menentukan nilai absorbansinya (Sophieyati *et al.*, 2024).

d. Pembuatan seri larutan standar

Larutan hidrokuinon 5000 ppm diencerkan menjadi konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm dengan mengambil 100; 200; 300; 400; dan 500  $\mu$ L menggunakan mikropipet, lalu dimasukkan secara berurutan ke labu takar berkapasitas 10,0 mL. Setelah itu, etanol 96% ditambahkan hingga tanda batas, dan kemudian larutan dihomogenkan (Nasiroh *et al.*, 2024).

e. Penetapan kadar sampel krim pemutih dengan metode densitometri

Plat KLT yang telah dilihat bercaknya pada sinar UV 254 nm dan terdapat sampel yang mengandung hidrokuinon, kemudian plat KLT dimasukkan pada alat pembaca densitometer. Bercak yang terbentuk dilihat pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Luas area di bawah kurva (AUC) yang dihasilkan digunakan sebagai dasar perhitungan kadar hidrokuinon pada sampel (Harimurti *et al.*, 2021).

## H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

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

Untuk mengetahui keberadaan hidrokuinon dalam krim pemutih, dilakukan perhitungan nilai Rf. Nilai Rf yang diperoleh dari sampel kemudian dibandingkan dengan nilai Rf dari baku pembanding hidrokuinon untuk memastikan apakah sampel tersebut mengandung hidrokuinon atau tidak (Harimurti *et al.*, 2021). Rumus perhitungan Rf sebagai berikut:

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

## 2. Analisis Densitometri

### a. Penetapan kadar hidrokuinon

Penetapan kadar hidrokuinon dilakukan dengan menganalisis data hasil penelitian dengan menerapkan hubungan linear  $y = bx + a$ . Persamaan ini diterapkan untuk mengkaji hubungan antara konsentrasi sampel (X) dan nilai luas area di bawah kurva (y) (Lestari & Prasasti, 2018).

Nilai X didapatkan dari  $y = bx + a$  atau  $x = \frac{y-a}{b}$ . Selanjutnya kadar hidrokuinon dihitung dengan rumus berikut (Sophieyati *et al.*, 2024) :

$$\% \text{ Kadar} = \frac{C \times V \times F_p}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

C = Konsentrasi sampel (mg/mL)

V = Volume awal (mL)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat sampel (mg)

### b. Nilai Rata-rata ( $\bar{X}$ )

Nilai rata-rata merupakan representasi dari sekumpulan data. *Mean* atau rata-rata dihitung dengan menjumlahkan semua data yang diperoleh, kemudian membaginya dengan jumlah data yang ada (Fitria *et al.*, 2018)

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

### c. Standar Deviasi (SD)

Simpangan baku adalah ukuran yang digunakan untuk menentukan seberapa jauh data bervariasi dari nilai rata-rata (Yusniyanti & Kurniati, 2017).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

### d. Coefficient Variation (CV)

Koefisien variasi adalah nilai yang membandingkan deviasi standar dengan nilai rata-rata aritmatika (Yusniyanti & Kurniati, 2017).

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

Keterangan:

CV = Koefisien variasi

SD = Standar deviasi

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

e. *Limit of error* (LE)

Batas kesalahan (LE) merupakan suatu rentang nilai yang diperkirakan dapat menutupi nilai sebenarnya dari populasi (Hazra, 2017).

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

Keterangan :

LE = *Limit of error*

T = Nilai t yang diperoleh dari tabel distribusi *t-student*

SD = Standar deviasi

N = Jumlah sampel

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI  
YOGYAKARTA