

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yakni krim pemutih wajah yang dijual di Lombok Tengah.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini yakni krim pemutih wajah yang memiliki keterangan *whitening cream* di kemasan

B. Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan objek yang akan dijadikan sebagai contoh, ukuran dan ciri yang dapat dimiliki suatu objek pada penelitian tertentu (Notoatmodjo, 2012). Ada dua jenis variabel variabel utama dalam penelitian ini, yakni variabel bebas dan variabel terikat.

1. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yakni penyimpanan krim pemutih wajah

2. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat yakni variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini yakni kadar hidrokuinon.

C. Definisi Operasional Variabel Utama

1. Krim pemutih adalah campuran bahan kimia dan atau bahan lainnya dengan khasiat bisa memucatkan noda hitam pada kulit.
2. Hidrokuinon adalah salah satu senyawa fenol. Hidrokuinon bekerja sebagai pemutih dengan melakukan penghambatan pada kosidasi tirosin dengan cara enzimatik menjadi 3,4-dihydrophenylalnine (DOPA). Kerja enzim tironase pada melanosit juga akan terhambat sehingga jumlah melanin berkurang.
3. Spektrofotometri Uv-Vis adalah alat yang dipakai dalam pengukuran transmiansi, reflektansi serta absorbansi. Panjang gelombang dapat berfungsi didasarkan dengan cuplikan yakni berguna untuk mengukur dibagian daerah ultraviolet dan daerah

tampak. Spektrofotometri Uv-Vis (Ultra Violet-Visibel) ialah alat yang berguna untuk analisa suatu senyawa kimia.

D. Alat dan Bahan

Pengumpulan data dilakukan di laboratorium kimia dimana alat yang digunakan adalah alat yang ada atau telah disediakan di laboratorium penelitian.

1. Bahan

Baku hidrokuinon, krim pemutih wajah, aquades, etanol (C₂H₅OH) 96%, pereaksi FeCl₃, reagen Benedict, Floroglusinon 1%, NaOH 0,5 N

2. Alat

Neraca analitik, labu takar 100 mL, labu takar 10 mL, labu takar 50 mL, labu takar 5 mL, kertas saring, corong, kuvet, pipet volume, beaker gelas, rak tabung, tabung reaksi, spektrofotometri UV-Vis

E. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Larutan Floroglusin 1% (Departemen Kesehatan RI, 1995).

Ditimbang 1 g floroglusin dengan seksama kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan etanol 96% sampai volume 100 ml.

2. Pembuatan NaOH 0,5 N (Departemen Kesehatan RI, 1995)

Ditimbang 2 g NaOH dengan seksama lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, setelah itu ditambahkan aquadestilat sebanyak 100 mL.

3. Uji Kualitatif Hidrokuinon

3.1. Pereaksi FeCl₃. Ditimbang masing-masing sampel krim sebanyak 0,1 g dan dilarutkan menggunakan 5 mL etanol 96% lalu dihomogenkan. Kemudian ditambahkan 5 tetes FeCl₃. Hasil positif apabila terbentuk warna hijau hingga hitam pada pereaksi FeCl₃ (Chakti dkk., 2019).

3.2. Pereaksi Benedict. Ditimbang masing-masing sampel krim sebanyak 0,1 g dan dilarutkan menggunakan 5 mL etanol 96% lalu homogenkan. Kemudian ditambahkan 5 tetes pereaksi benedict. Hasil positif apabila terbentuk warna merah pada pereaksi benedict (Chakti dkk., 2019).

3.3. Kromatografi Lapis Tipis. Ditimbang hidrokuinon murni dan sampel masing-masing sebanyak 2 gr kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass 25 mL. Selanjutnya ditambahkan etanol 96% sebanyak 15 mL. Campuran dihomogenkan diatas penangas air dengan suhu 70°C selama 10 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam penangas es sampai terpisah lemak dan lilin dengan fase cair lalu disaring. Menyiapkan plat KLT lalu menjenuhkan fase gerak terlebih dahulu menggunakan kertas saring. Fase gerak yang dipakai adalah kloroform:metanol (1:1). Setelah itu ditotolkan dengan jarak tepi bawah plat 1 cm dan jarak tepi atas 0,5 cm. Plat dimasukkan dalam chamber yang fase geraknya sudah jenuh dan dibiarkan sampai terelusi sempurna. Kemudian plat KLT diangkat dan dikeringkan, noda hasil pemisahan diamati dibawah cahaya lampu UV₂₅₄ nm kemudian dihitung nilai Rf (Sarah, 2014).

4. Uji Kuantitatif Hidrokuinon

4.1. Pembuatan larutan baku hidrokuinon. Ditimbang 50 mg hidrokuinon murni kemudian larutkan menggunakan etanol 96% secukupnya. Pindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 100 mL ad etanol 96% hinggatepat 100 mL. Kocok sampai homogen,lalu diperoleh larutan baku sebesar 500 ppm dalam etanol 96%.

4.2. Penentuan panjang gelombang maksimum. Dibuat larutan baku kerja 10 ppm sebanyak 25 mL. Untuk penentuan panjang gelombang dipipet larutan baku kerja konsentrasi 10 ppm sebanyak 200 µL dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi floroglusin 1% dan 1 mL NaOH 0,5 N, kemudian dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 70°C selama 15 menit. Didinginkan larutan di dalam air dengan suhu 25°C. lalu tambahkan NaOH 0,5 N sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan mikropipet. Larutan dikocok sampai tercampur secara merata kemudian dibaca absorbansi larutan tersebut dengan panjang gelombang 400-700 nm sampai dihasilkan panjang gelombang tertentu.

4.3. Penentuan *Operating Time*. Larutan baku kerja konsentrasi 10 ppm dipipet sebanyak 200 µL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL lalu ditambahkan 1 mL pereaksi florogusin 1% dan NaOH 0,5 N sebanyak 1 mL. Kemudian dipanaskan pada penangas air dengan suhu 70°C selama 15 menit, lalu didinginkan di air dengan suhu 25°C. Setelah itu ditambahkan NaOH 0,5 N ke dalam labu ukurmemakai mikropipet sampai tanda batas.Absorbansi

dibaca pada menit ke 0 sampai menit ke 60 pada panjang gelombang tertentu sehingga diperoleh *operating time*.

4.4. Pembuatan kurva baku Hidrokuinon. Dibuat masing-masing larutan hidrokuinon dengan konsentrasi 0,5 – 3 ppm dengan jumlah tertentu sesuai perhitungan dengan mikropipet, lalu masing masing konsentrasi dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Kemudian ditambahkan pereaksi floroglusin 1% sebanyak 1 mL dan larutan NaOH 0,5 N sebanyak 1 mL. Setelah itu dipanaskan pada penangas air dengan temperatur 70°C selama 15 menit, lalu didinginkan dalam air dengan suhu 25°C. Ditambahkan NaOH 0,5 N dengan mikropipet sampai tanda batas pada labu ukur. Didiamkan selama *operating time* lalu dibaca masing-masing absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan blanko NaOH. Absorbansi yang dihasilkan pada setiap konsentrasi dimasukkan ke dalam regresi linier sehingga terbentuk persamaan kurva baku yakni $Y = bx + a$. Persamaan kurva baku yang diperoleh digunakan dalam perhitungan kadar.

4.5. Kondisi Penyimpanan Sampel Krim. Dilakukan perlakuan parameter dengan melihat perbedaan kadar hidrokuinon dalam krim dengan perlakuan sampel ditutup yang dibedakan dalam kondisi atau suhu yang berbeda, yaitu :

- a. Satu sampel ditaruh diruangan ber-AC suhu sejuk, sampel dibiarkan tertutup.
- b. Satu sampel ditaruh di almari es tetapi bukan didalam freezer, sampel dibiarkan tertutup.
- c. Satu sampel ditaruh ditempat terbuka atau suhu kamar, sampel dibiarkan tertutup.

4.6. Penetapan kadar hidrokuinon. Ditimbang sampel krim masing-masing $\pm 100 - 150$ mg. Larutkan menggunakan etanol 96% sebanyak 5 mL, lalu sonifikasi dalam waktu 3 menit. Menyaring larutan ke dalam labu takar 10 mL menggunakan kertas saring, lalu ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas. Dipipet larutan tersebut sebanyak 100 μ L kemudian masukkan ke dalam labu ukur 5 mL, ad etanol 96% sampai tanda batas. Dipipet kembali hasil larutan tersebut sebanyak 500 μ L kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, ditambahkan larutan floroglusin 1% sebanyak 1 mL dan NaOH 0,5 N sebanyak 1 mL, dipanaskan pada suhu 70°C selama 15 menit kemudian didinginkan pada suhu 25°C. Ditambahkan NaOH 0,5 N sampai tanda

batas pada larutan tersebut. Didiamkan pada *operating time* lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Replikasi masing-masing sampel sebanyak 3 kali.

5. Validasi Metode

5.1. Linearitas. Pengujian linieritas dilakukan dengan mengukur absorbansi hidrokuinon konsentrasi 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 dan 3 ppm, dengan persyaratan koefisien korelasi (r) mendekati 1 (Miller, 2005).

5.2. Batas deteksi (*Limit of Detection*, LOD) dan Batas Kuantifikasi (*Limit of Quantification*, LOQ). Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dihitung dari persamaan regresi kurva kalibrasi baku pembanding. Langkah-langkah perhitungan penentuan LOQ dan LOQ yaitu menentukan nilai y' dengan rumus $y=a+bx$ menggunakan hasil dari perhitungan linearitas, setelah itu dihitung $(y-y')$ ² lalu hasilnya dirata-ratakan. Selanjutnya dihitung nilai sigma

$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y-y')^2}{n-2}}$ untuk menentukan LOD dan LOQ, selanjutnya

dihitung menggunakan rumus $LOD = \frac{3 S_{y/x}}{b}$ dan $LOQ = \frac{3 S_{y/x}}{b}$

Untuk linieritas, sebaiknya harga $V_{x0} \leq 2\%$ (Ahuya, 2000).

5.3. Presisi. Pengujian presisi dilakukan dengan mengukur absorbansi hidrokuinon sebanyak 10 kali pada konsentrasi 1,5 ppm untuk memperoleh nilai absorbansi. Setelah itu mencari konsentrasi sebenarnya menggunakan rumus $\frac{y-a}{b}$ lalu dirata-ratakan, selanjutnya menghitung nilai SD dan RSD menggunakan rumus $\% RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$. Persyaratan $RSD \leq 2\%$ dengan rumus $\%RSD = SD \times 100\%$ (Miller 2005).

5.4. Akurasi. Pengujian akurasi dilakukan dengan mengukur absorbansi hidrokuinon konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, dan 3 ppm. Masing – masing diukur sebanyak tiga kali, lalu didapatkan hasil absorbansi di setiap konsentrasi. Langkah perhitungannya yaitu dengan menghitung nilai X dengan rumus $\frac{y-a}{b}$, setelah itu dihitung konsentrasi dalam % menggunakan nilai X dan konsentrasi lalu dirata-ratakan. Dengan persyaratan % perolehan kembali 90%-110% (Miller 2005).