

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian menggunakan sampel kosmetik berupa krim pemutih wajah di Palangka Raya.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian menggunakan sebanyak tiga merek krim wajah pemutih dari Palangkaraya yang dibeli secara online, kemudian diberi label A, B, dan C.

2.1 Kriteria Inklusi. Kriteria inklusi dalam penelitian ialah sampel krim pemutih wajah pemutih yang beredar di Palangka Raya. Kondisi sampel krim baru buka bungkus, belum kadaluarsa, tidak terdaftar di BPOM.

2.2 Kriteria Eksklusi. Kriteria eksklusi dalam penelitian ialah sampel krim pemutih wajah yang telah memiliki izin edar pihak BPOM.

B. Variabel Penelitian

1. Variabel penelitian

Adalah suatu penilaian yang dapat membantu peneliti untuk memperoleh kesimpulan akhir sehingga peneliti mengetahui apa pengaruh dan akibat dari pemilihan suatu subjek penelitian (Sugiyono, 2016).

1.1 Variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian adalah krim wajah pemutih yang beredar di Palangka Raya.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian adalah kadar hidrokuinon menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dan kadar merkuri dan timbal menggunakan spektrofotometri SSA.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian adalah validasi metode analisis pada baku hidrokuinon meliputi linearitas, LOD, LOQ, presisi, akurasi.

2. Klasifikasi Variabel Utama

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian yakni menggunakan kosmetika berupa krim pemutih wajah yang beredar di Palangka Raya dengan variasi merek berbeda.

2.2 Variabel terikat. Variabel terikat dalam penelitian yakni penetapan kadar hidrokuinon, kadar merkuri, dan kadar timbal pada krim wajah pemutih.

2.3 Variabel terkendali. Variabel terkendali dalam penelitian yakni krim pemutih wajah pemutih dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri serapan atom.

2.4 Variabel tak terkendali. Variabel tak terkendali dalam penelitian yakni suhu penyimpanan krim dan kelembaban ruangan pada saat pengujian yang mungkin dapat merusak sampel.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, krim wajah pemutih yang dipilih adalah krim kemasan dengan variasi merek dan belum terdaftar dalam BPOM.

Kedua, melakukan analisis uji secara kualitatif untuk mengetahui ada tidaknya keberadaan senyawa hidrokuinon, logam merkuri dan timbal.

Ketiga, melakukan analisis uji secara kuantitatif dengan menentukan kadar hidrokuinon menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis dengan mengukur absorbansi sampel pada panjang gelombang 294 nm.

Keempat, melakukan validasi metode analisis pada baku hidrokuinon menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis meliputi linearitas, LOD, LOQ, presisi, dan akurasi.

Kelima, apabila dinyatakan positif mengandung cemaran logam merkuri dan timbal maka dilanjutkan tahap menentukan kadar cemaran logam dalam sampel menggunakan analisis spektrofotometri serapan atom dengan mengukur absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm untuk merkuri dan panjang gelombang 217,0 nm untuk timbal.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Penggunaan alat dalam penelitian yaitu timbangan analitik Ohaus[®], cawan porselin, api bunsen, plat tetes, kawat tembaga, kaca arloji, kertas saring *whatmann* no. 24, spektrofotometri UV-Vis *Hitachi*

U2900 dan spektrofotometri Serapan Atom *iCE-3500* GFZ dan VP100, ampas, vial, labu ukur, dan *hotplate*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu krim pemutih yang belum teregistrasi BPOM, baku hidrokuinon ($C_6H_6O_2$), baku merkuri (HgCl), baku timbal (Pb), etanol p.a, aquadest, kalium iodide 0,5 N p.a, HCl pekat p.a, reagen benedict, asam asetat p.a, natrium sulfat p.a, dan asam nitrat p.a.

D. Jalannya Penelitian

1. Analisis Hidrokuinon Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

1.1 Analisis kualitatif

1.1.1 Pengamatan uji organoleptik. Pengujian meliputi bau, tekstur, dan warna sampel krim (Chakti *et al.*, 2019).

1.1.2 Pengamatan pereaksi warna benedict. Menimbang 0,0010 g sampel krim wajah pemutih diletakkan di dalam plat tetes kemudian ditambah 4 tetes pereaksi benedict. Hasil positif jika terjadi perubahan warna hijau, kuning atau merah bata (Irmatika *et al.*, 2023).

2.2 Analisis Kuantitatif

2.2.1 Pembuatan larutan stok hidrokuinon. Menimbang 0,1007 g hidrokuinon baku larutkan dalam 10 mL etanol p.a kocok hingga homogen, kemudian masukkan ke dalam labu terukur 100 mL tuangkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan induk diperoleh konsentrasi 1007 ppm. Lakukan pengenceran karena terlalu pekat maka ambil 10 mL dari larutan baku tuangkan dalam labu ukur 100 mL dan tambahkan etanol p.a hingga tanda batas dan diperolehlah larutan baku dengan konsentrasi 100,7 ppm (Yulia *et al.*, 2020).

2.2.2 Menentukan panjang gelombang maksimum hidrokuinon. Mengambil larutan baku hidrokuinon dengan konsentrasi 100,7 ppm, dibuat spektrum serapan dari panjang gelombang dengan alat spektrofotometri UV-Vis, pipet sebanyak 2 mL dari larutan induk tuangkan dalam labu ukur 10 mL kemudian tuangkan etanol p.a hingga tanda batas. Sebanyak 20,14 ppm larutan standar dimasukkan ke dalam kuvet spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200 - 400 nm sebagai panjang gelombang maksimum (Yulia *et al.*, 2020). Panjang gelombang maksimum baku hidrokuinon dari rentang 285 – 297 nm (Hamzah *et al.*, 2022).

2.2.3 Menentukan *operating time* hidrokuinon. Mengambil larutan baku hidrokuinon dengan konsentrasi 100,7 ppm, diuji waktu stabil dari larutan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis, pipet sebanyak 2 mL dari larutan induk tuangkan dalam labu ukur 10 mL kemudian tuangkan etanol p.a hingga tanda batas. Sebanyak 20,14 ppm larutan baku dimasukkan ke dalam kuvet spektrofotometri UV-Vis, larutan kemudian diukur absorbansinya mulai dari rentang waktu 0 sampai 60 menit pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Yulia *et al.*, 2020).

2.2.4 Pembuatan larutan standar hidrokuinon. Larutan baku 100,7 ppm dipipet masing-masing 1 mL; 1,2 mL; 1,4 mL; 1,6 mL; 1,8 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan larutkan masing-masing dengan etanol p.a sampai tanda batas. Konsentrasi seri pengenceran di peroleh 10,07 ppm; 12,08 ppm; 14,10 ppm; 16,11 ppm; 18,13 ppm (Musiam *et al.*, 2019).

2.2.5 Pembuatan sampel untuk pembacaan kadar hidrokuinon. Menimbang masing-masing sampel krim wajah sebanyak 0,1000 g masukkan ke dalam *beakerglass* 100 mL lalu larutkan 2 mL etanol p.a aduk hingga homogen lalu saring dengan kertas penyaring simpan hasil saringan ke dalam labu terukur 10 mL tambahkan etanol p.a hingga tanda batas, kemudian diencerkan dengan memipet 1 mL menggunakan pipet volume 1 mL masukkan ke dalam labu terukur 10 mL tambahkan etanol p.a hingga tanda batas kocok hingga homogen lalu masukkan ke dalam vial kosong. Lakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada sampel. Setelah itu, lakukan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometri UV-Vis (Yulia *et al.*, 2020). Kemudian, nilai absorbansi sampel dihitung berdasarkan persamaan regresi yang didapatkan pada penentuan kurva standar (Primadiamanti *dkk*, 2019).

2.2.6 Validasi metode analisis. Metode analisis menggunakan kadar hidrokuinon setelah pengujian dengan spektrofotometri UV-Vis bertujuan untuk memverifikasi kebenaran yang valid dengan memperhatikan parameter nilai linearitas, *Limit of Detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ), presisi, dan akurasi.

1.2.6.1 Linearitas. Menentukan linearitas perlu mengukur hasil absorbansi dari seri konsentrasi larutan baku hidrokuinon lalu mencari persamaan regresi linear dan menentukan koefisien korelasinya. Nilai koefisien korelasi (r) tercapai apabila nilai r mendekati 1 artinya

hubungan linearitas konsentrasi analit dengan absorbansi terukur baik (Chakti *et al.*, 2019).

1.2.6.2 LOD dan LOQ. Nilai pengukuran LOD dan LOQ diperoleh dari nilai b (*slope*) pada persamaan garis linear $y = a + bx$ (Harmita, 2004).

1.2.6.3 Presisi. Penentuan presisi dilakukan berulang sebanyak 6 kali replikasi, presisi dicantumkan dalam persen baku relatif (RSD %) menggunakan seri konsentrasi 10,07 ppm. Hasil presisi dikatakan baik apabila diperoleh nilai % RSD kurang dari 2% (Harmita, 2004).

1.2.6.4 Akurasi. Penentuan akurasi dilakukan dengan menganalisis kedekatan hasil pembacaan kadar terukur dengan kadar sebenarnya yang dicantumkan dalam persen perolehan kembali (%*recovery*). Menggunakan seri konsentrasi 14,10 ppm; 16,11 ppm; 18,13 ppm. Nilai perolehan kembali (%) dinyatakan memiliki akurasi baik apabila berada pada rentang 99,0 – 100,5% (DepKes RI, 2020).

2. Analisis logam berat menggunakan Spektrofotometri Serapan Atom

2.1 Analisis Kualitatif

2.1.1 Pengamatan uji organoleptik. Pengujian meliputi bau, tekstur, dan warna sampel krim (Chakti *et al.*, 2019).

2.1.2 Pengamatan pereaksi warna KI. Menimbang 0,0010 g sampel ke dalam cawan porselin kemudian tambahkan HNO₃ pekat, panaskan dengan api lalu saring dengan kertas saring. Masukkan larutan uji 1 mL tuangkan ke tabung reaksi dengan penambahan 5 tetes larutan KI 0,5 N (Ayuni dan Yuningrat, 2014).

2.1.2.1 Pembuatan KI sebagai pereaksi warna cemaran logam. Menimbang 0,3693 g serbuk kalium iodide, kemudian dilarutkan dengan aquadest 20 mL homogen dalam vial tabung 20 mL. Kalium iodide memiliki konsentrasi 1%. Timbang masing-masing sampel dan baku merkuri sebanyak 1 g letakkan di dalam tabung berikan KI sebanyak 5 tetes gojok perlahan hingga terjadi reaksi perubahan warna. Hasil positif jika dididihkan terbentuk endapan merah yakni merkuri (HgCl), dan merkuri hitam yang berbutir halus (Chakti *et al.*, 2019). Kemudian, tambahkan NaOH 5 tetes dan HCl 5 tetes, hasil positif jika terbentuk endapan putih yakni logam berat timbal (Pb) (Ayuni dan Yuningrat, 2020).

2.1.3 Pengamatan nyala api. Menimbang sampel krim wajah sebanyak 0,0100 g dilarutkan dalam aquadest 1,25 mL kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan HCl pekat. Amplas kawat tembaga kemudian dicelupkan ke dalam campuran larutan uji. Positif merkuri ditandai dengan perubahan nyala api menjadi warna hijau dan positif timbal ditandai dengan perubahan nyala api menjadi warna biru atau putih (Chakti *et al.*, 2019).

2.2 Analisis Kuantitatif.

2.2.1 Pembuatan larutan aqua regia. Menimbang asam klorida lalu tambahkan HNO₃ pekat dengan perbandingan (3:1) maka diperoleh 37,5 mL : 12,5 mL tuangkan ke labu terukur 50 mL kocok hingga homogen (Trisnawati *et al.*, 2017).

2.2.2 Preparasi sampel krim dengan metode destruksi basah. Menimbang 0,0005 g sampel krim wajah larutkan dengan aqua regia sebanyak 20 mL masukkan dalam *beakerglass* 100 mL tutup dengan kaca arloji letakkan pada lemari asam. Kemudian, panaskan pada suhu 100°C dengan *hotplate* selama 5 jam sampai larutan jernih. Diamkan hingga dingin kemudian saring dengan kertas *whatmaan* no. 42 tuangkan ke labu terukur 100 mL tambahkan aquadest hingga tanda batas lalu pindahkan ke dalam botol kaca tertutup rapat (Anggraeni *et al.*, 2018).

2.2.3 Pembuatan larutan stok merkuri. Menimbang 0,1354 g baku merkuri larutkan dalam 100 mL air suling atau aquabidest lalu kocok hingga homogen tuangkan aquabidest hingga tanda batas. Larutan induk diperoleh konsentrasi 1354 ppm. Kemudian, lakukan pengenceran larutan induk. Pipet 10 mL larutan induk lalu tuangkan ke labu terukur 100 mL pelarut H₄SO₄ hingga tanda batas dan diperoleh konsentrasi baku merkuri ialah 135,4 ppm (BSN, 1998).

2.2.4 Pembuatan kurva kalibrasi merkuri. Kurva kalibrasi menggunakan enam seri konsentrasi masing-masing sebanyak 0 µg/L; 1 µg/L; 2 µg/L; 3 µg/L; 4 µg/L; 5 µg/L. Sebelumnya, kurva kalibrasi terlalu pekat dilakukan pengenceran dari setengah larutan menjadi 100 mL sehingga faktor pengenceran adalah 200 kali (BSN, 1998).

2.2.5 Pembuatan larutan stok timbal. Menimbang 0,1354 g baku timbal larutkan dalam 100 mL air suling atau aquabidest kocok hingga homogen lalu tuangkan aquabidest hingga tanda batas. Larutan induk diperoleh konsentrasi 1354 ppm. Kemudian, lakukan

pengenceran larutan induk. Pipet 10 mL larutan induk lalu tuangkan ke labu terukur 100 mL tambahkan aquabidest hingga tanda batas dan diperoleh konsentrasi baku timbal ialah 135,4 ppm (BSN, 1998).

2.2.6 Pembuatan kurva kalibrasi timbal. Kurva kalibrasi timbal menggunakan tujuh seri pengenceran masing-masing sebanyak 0,0 ppm; 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,5 ppm; 1,0 ppm; 1,5 ppm; 2,0 ppm. Sebelumnya, kurva kalibrasi terlalu pekat dilakukan pengenceran dari setengah larutan menjadi 100 mL sehingga faktor pengenceran adalah 200 kali (BSN, 1998).

2.2.7 Penetapan kadar cemaran logam merkuri dan timbal dalam sampel. Pengukuran nilai kadar merkuri dan timbal dalam sampel krim wajah pemutih absorbansi sampel dibaca menggunakan SSA, pada panjang gelombang 217,0 nm untuk timbal dan 253,7 nm untuk merkuri. Kemudian, lakukan analisis data kadar menggunakan SSA dengan pembacaan persamaan garis kurva baku $Y = a + bx$ (BSNI, 2016).

E. Analisis Hasil

1. Uji organoleptik

Uji organoleptik merupakan uji pendahuluan sebagai penilaian secara visual untuk mengetahui bau, tekstur dan warna dari sampel krim wajah pemutih yang akan dilakukan analisis (Chakti *et al.*, 2019).

2. Uji kualitatif hidrokuinon

Sampel yang mengandung hidrokuinon apabila ditambahkan dengan reagen benedict akan membentuk reaksi warna hijau, kuning atau merah bata (Irmatika *et al.*, 2023).

3. Uji kuantitatif hidrokuinon

Membuat larutan standar baku hidrokuinon dengan konsentrasi 100 ppm dengan pelarut etanol p.a. Penentuan panjang gelombang maksimum hidrokuinon dan OT ditentukan dengan bantuan spektrofotometri UV-Vis. Kemudian, menentukan kurva baku yang akan digunakan dengan konsentrasi satuan ppm. Lakukan pembacaan absorbansi pada masing-masing kurva baku untuk mencari nilai a, b, r. Persamaan regresi linear diperoleh dari data konsentrasi vs absorbansi dengan persamaan, sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y = absorbansi sampel

a = Intercept

b = Slope atau kemiringan

r = koefisien korelasi

Kemudian, lakukan penetapan nilai absorbansi sampel krim wajah pemutih yang telah dilakukan preparasi sampel. Hasil absorbansi sampel yang diperoleh dimasukkan ke dalam data persamaan regresi linear sebagai nilai y .

4. Validasi metode analisis

Validasi analisis adalah suatu pedoman yang digunakan sebagai syarat keberterimaan suatu produk dalam prosedur operasional baku (DepKes RI, 2020).

4.1 Linearitas. Koefisien kuadrat dapat diterima jika nilai ($r^2 \geq 0,998$) menunjukkan linearitas dan kemiringan harus tidak berbeda secara bermakna dari nol. Penggunaan pelarut organik dapat meningkatkan kelarutan obat pada pembuatan larutan baku, namun koefisien fungsi regresi ($V \times 0$) tidak boleh lebih dari 5% (v/v) pelarut organik, kecuali dilakukan validasi (DepKes RI, 2020).

4.2 Presisi. Presisi dilakukan untuk memperkirakan simpang baku (SD) dan simpang baku relatif (RSD) dengan pengulangan pembacaan absorbansi larutan sebanyak 6 kali dengan konsentrasi (ppm) larutan yang sama. Standar persyaratan presisi adalah kurang dari 2% (DepKes RI, 2020).

4.3 LOD dan LOQ. LOD dilakukan dengan menganalisis sampel terhadap kandungan analit di atas atau di bawah syarat batas deteksi. Sedangkan LOQ dengan menganalisis sampel terhadap konsentrasi analit di atas atau di bawah syarat kuantitasnya (DepKes RI, 2020).

4.4 Akurasi. Nilai akurasi dilihat dari %*recovery* atau persen perolehan kembali dari penetapan analit, penetapan akurasi menggunakan tiga konsentrasi berbeda dari kurva kalibrasi kemudian dilakukan pengulangan pembacaan absorbansi larutan sebanyak 3 kali. Standar persyaratan akurasi adalah 99,0 - 100,5% (DepKes RI, 2020).

5. Uji kualitatif cemaran logam merkuri dan timbal

Sampel yang mengandung merkuri apabila ditambahkan dengan larutan KI akan membentuk reaksi warna berupa endapan hijau dan bila dididihkan terbentuk endapan merah hingga kehitaman (Chakti *et al.*, 2019). Sampel yang mengandung timbal apabila ditambahkan dengan larutan KI tambah NaOH dan HCl akan terbentuk endapan putih (Ayuni da Yuningrat, 2014).

6. Uji kuantitatif cemaran logam merkuri dan timbal

Membuat larutan standar baku standar merkuri dan timbal dengan pelarut aquabidest. Penentuan panjang gelombang maksimum merkuri dan timbal ditentukan dengan bantuan spektrofotometri serapan atom. Kemudian, menentukan kurva baku yang akan digunakan dengan konsentrasi satuan $\mu\text{g/L}$ atau mg/L atau ppm. Lakukan pembacaan absorbansi pada masing-masing kurva baku untuk mencari nilai a, b, r. Persamaan regresi linear diperoleh dari data konsentrasi vs absorbansi dengan persamaan, sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y = absorbansi sampel

a = Intercept

b = Slope atau kemiringan

r = koefisien korelasi

Kemudian, lakukan penetapan nilai absorbansi sampel krim wajah pemutih yang telah dilakukan preparasi sampel. Hasil absorbansi sampel yang diperoleh dimasukkan ke dalam data persamaan regresi linear sebagai nilai y.