

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

#### **1. Populasi**

Populasi adalah seluruh variabel yang terkait penelitian dimana telah ditetapkan peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Populasi yang digunakan yaitu obat krim yang mengandung hidrokuinon 2% merk “M”.

#### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan yaitu obat krim yang mengandung hidrokuinon 2% merk “M” yang disimpan pada kondisi penyimpanan (suhu) yang berbeda.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama penelitian ini yaitu kondisi penyimpanan yang berbeda.

#### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel bebas (independen) adalah variabel yang dapat diubah untuk mempelajari dampaknya terhadap variabel tergantung (dependen). Pada penelitian, variabel bebas yang dimaksud adalah kondisi penyimpanan yang berbeda (suhu).

Variabel tergantung merupakan variabel inti permasalahan dalam penelitian. Pada penelitian ini, variabel tergantung yang dimaksud adalah kadar hidrokuinon pada obat krim pada kondisi penyimpanan yang berbeda.

Variabel terkendali merupakan variabel yang perlu dikontrol karena dapat mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali yang dimaksud yaitu kondisi penyimpanan (suhu) dan lama penyimpanan.

#### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Pertama, krim pemutih merupakan sediaan yang mengandung zat aktif yang dapat menekan melanin atau menghambat, sehingga dapat mengubah warna kulit gelap menjadi cerah.

Kedua, penggunaan hidrokuinon pada obat dengan batas hidrokuinon 2%.

Ketiga, verifikasi metode analisis merupakan penilaian suatu

metode untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan dan dapat menghasilkan suatu data yang valid. Parameter validasi metode meliputi linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD), dan batas kuantitasi (LOQ).

Keempat, mengidentifikasi hidrokuinon dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-VIS, kemudian mengukur atau menghitung kadar hidrokuinon.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometri UV-VIS, timbangan analitik, labu ukur 100 mL, labu ukur 10 mL, batang pengaduk, spatula, kertas saring, corong, pipet volume, gelas ukur, dan *beaker glass*.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain baku hidrokuinon, obat krim yang mengandung hidrokuinon 2% merk "M", etanol pa, etanol 96%, pereaksi  $\text{FeCl}_3$ , dan reagen benedict.

### D. Jalannya Penelitian

#### 1. Pengujian Mutu Fisik Krim

Pengujian mutu fisik dilakukan dengan uji organoleptik. Uji ini meliputi konsistensi, warna, dan bau dari krim. Tujuan pengujian organoleptik untuk mendeskripsikan konsistensi, warna, dan bau dari krim yang disimpan pada suhu atau kondisi penyimpanan yang berbeda.

#### 2. Pengujian Kualitatif

**2.1 Pereaksi  $\text{FeCl}_3$ .** Sampel obat krim ditimbang 0,1 gram dilarutkan dengan menggunakan 5 mL etanol 96%, kemudian ditambahkan 5 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Terjadinya perubahan warna diamati, apabila terjadi perubahan menjadi warna kuning maka sampel positif mengandung hidrokuinon (Hendriyani *et al*, 2023).

**2.2 Pereaksi Benedict.** Sampel obat krim ditimbang 0,1 gram dilarutkan dengan menggunakan 5 mL etanol 96%, kemudian ditambahkan 4 tetes pereaksi benedict. Hasil positif apabila sampel berubah warna menjadi merah bata (Jauria *et al*, 2022).

#### 3. Analisis Kuantitatif dengan Alat Spektrofotometri UV-VIS

**3.1 Pembuatan Larutan Induk.** Ditimbang baku hidrokuinon sebanyak 10 mg, kemudian larutkan dengan etanol p.a dalam *beaker*

*glass*. Pindahkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu bilas *beaker glass* dengan sedikit etanol pa kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur, tambahkan etanol pa sampai tanda batas. Larutan dikocok sampai homogen. Larutan induk yang diperoleh yaitu 100 mg/L (ppm).

**3.2 Penentuan Panjang Gelombang.** Larutan induk hidrokuinon 100 mg/L (ppm) diambil sebanyak 2 mL masukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas, lalu dikocok hingga homogen. Ukur pada panjang gelombang 200-400 nm.

**3.3 Penentuan Operating Time.** Larutan induk hidrokuinon dengan konsentrasi 100 mg/L (ppm) dipipet sebanyak 2 mL menggunakan pipet volume, masukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas, lalu dikocok hingga homogen, didapatkan larutan dengan konsentrasi 20 mg/L (ppm). Absorbansi dibaca pada menit ke-0 sampai menit ke-60 pada panjang gelombang maksimum, diperoleh absorbansi konstan dengan rentang pembacaan setiap 1 menit (Tuladi *et al*, 2015).

**3.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi.** Larutan induk hidrokuinon dengan konsentrasi 100 mg/L (ppm) dipipet berturut-turut 1,0 mL; 1,2 mL; 1,4 mL; 1,6 mL; 1,8 mL; 2,0 mL, diperoleh konsentrasi seri pengenceran 10, 12, 14, 16, 18, 20 mg/L (ppm). Masing-masing pemipetan larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Masing-masing larutan didiamkan selama *operating time* lalu dibaca absorbansinya dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang maksimum.

**3.5 Kondisi penyimpanan Sampel Krim.** Dilakukan perlakuan kondisi parameter selama 28 hari dengan melihat perbedaan kadar hidrokuinon dalam obat krim dengan perlakuan sampel ditutup yang dibedakan dalam kondisi yang berbeda, yaitu : Satu krim ditaruh di ruangan, sampel dibiarkan tertutup. Satu sampel ditaruh di almari es tetapi bukan di dalam freezer, sampel dibiarkan tertutup. Satu sampel ditaruh pada tempat yang terkena paparan sinar matahari langsung yaitu diatas pilar teras rumah, sampel dibiarkan tertutup

**3.6 Pembuatan Larutan Sampel.** Ditimbang masing-masing 100 mg sampel obat krim yang disimpan di suhu ruang, suhu dingin, dan suhu panas kemudian dilarutkan dengan 2 mL etanol PA pada *beaker glass*, saring dengan kertas saring ke dalam labu ukur 10 mL,

kemudian tambahkan etanol PA sampai tanda batas. Masing-masing larutan sampel diencerkan dengan memipet sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, tambahkan etanol PA sampai tanda batas.

#### 4. Verifikasi Metode Analisis

**4.1 Linearitas.** Pengujian linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi hidrokuinon dengan konsentrasi 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm (mg/L). Kemudian menghitung nilai koefisien korelasi (r), dengan syarat nilai koefisien korelasi (r) mendekati 1.

**4.2 LOD dan LOQ.** LOD dan LOQ dihitung dari persamaan regresi kurva baku. Penentuan LOD dan LOQ yaitu dengan menentukan nilai  $y'$  dengan rumus  $y=a+bx$ , menggunakan hasil dari perhitungan linearitas, setelah itu menghitung  $(y-y')^2$ , lalu mencari konsentrasi (x) rata-rata. Menghitung nilai sigma, kemudian menghitung  $Sy/x$  untuk menentukan LOD dan LOQ dengan

$$\text{menggunakan rumus LOD} = \frac{(3,3 \times \frac{Sy}{X})}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{(10 \times \frac{Sy}{X})}{b}$$

**4.3 Akurasi.** Larutan induk 100 mg/L dipipet sebanyak 1,2 mL; 1,6 mL; dan 2,0 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, tambahkan etanol p.a sampai tanda batas, diamkan selama *operating time* kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Konsentrasi larutan yang diperoleh 12 mg/L, 16 mg/L, dan 20 mg/L. akurasi dilakukan sebanyak 3 replikasi tiap konsentrasi larutan. Selanjutnya menghitung nilai %*recovery* dengan menggunakan rumus

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Konsentrasi sampel yang terukur dari pengukuran}}{\text{Konsentrasi sampel sebenarnya}} \times 100\%$$

**4.4 Presisi.** Pengujian presisi dilakukan menggunakan 1 konsentrasi yaitu pada konsentrasi 10 mg/L (10 ppm) didiamkan selama waktu *operating time* kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum. Pengujian presisi dilakukan dengan enam kali replikasi. Setelah mendapatkan nilai absorbansi, kemudian mencari nilai konsentrasi sebenarnya dengan menggunakan rumus  $\frac{y-a}{b}$  lalu dirata-ratakan, selanjutnya menghitung nilai %SD dan %RSD dengan menggunakan rumus  $\% \text{ RSD} = \frac{SD}{X \text{ rata-rata}} \times 100 \%$

## 5. Mengukur Kadar Hidrokuinon

Masing-masing sampel yang sudah diencerkan dari 3 sampel (sampel yang di simpan pada suhu ruang, suhu dingin, dan suhu panas) yang telah dibuat dimasukkan ke dalam kuvet. Sampel dibaca absorbansi dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 294 nm. Masing-masing pengukuran sampel direplikasi sebanyak 3 kali tiap variasi kondisi penyimpanan (suhu). Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk mencari konsentrasi dengan menggunakan persamaan regresi linear ( $C_{reg}$ ).

Kadar hidrokuinon dapat dihitung dengan rumus:

$$\%kadar = \frac{C_{reg} \times faktor\ pembuatan \times f_p}{Berat\ sampel\ (mg)} \times 100\%$$

Keterangan:

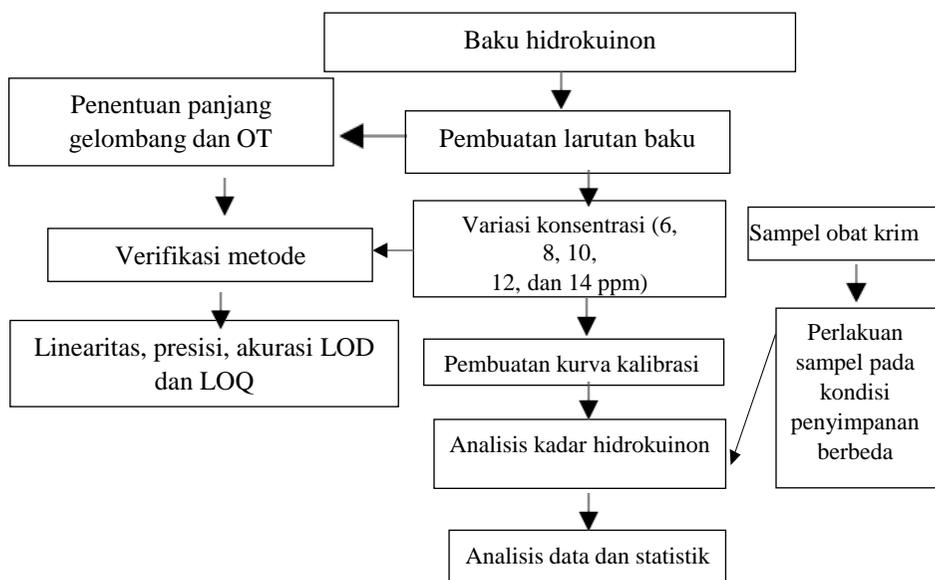
$C_{reg}$  = Konsentrasi regresi linear

$f_p$  = Faktor pengenceran

## E. Analisis Data

Hasil pengujian dianalisis dengan membandingkan hasil dan metode statistik menggunakan software SPSS. Analisis data menggunakan *Shapiro-Wilk*, jika data terdistribusi normal ( $\text{sig} > 0,05$ ). Kemudian uji homogenitas menggunakan *Levene's test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan uji *Two Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat apakah lama penyimpanan dan suhu penyimpanan berpengaruh signifikan terhadap kadar hidrokuinon dalam obat krim. Jika ditemukan perbedaan yang signifikan dilakukan pengujian *post host* dengan *Tukey*.

## F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 5. Skema Jalannya Penelitian