# BAB III

# METODE PENELITIAN

## 3.1RancanganPenelitian

Rancangpenelitian yang digunakanadalahmetodeeksperientaldenganpenentuankadarHidrokuinondanAsamRetinoatpadakrimmalam yang dijualdikotamedansecaraspektrofotometri ultraviolet denganmetode*dual wavelength* Populasinyaadalahkrimmalam yang dijual di kotamedan.Sampel diambil dari 4 produk krim malam yang ada di kota medan. Sebagai kontrol negatif digunakan basis krim tanpa penambahan Hidrokuinon dan Asam Retinoat dan untuk kontrol positif digunakan sampel simulasi dengan krim pemutih yang mengadung bahan aktif sam retinoat 0,001% - 0,40% dan hidrokuinon 2 %. Data yang didapat berdasarkan hasil analisis laboratorium dengan menggunakan Spektrofotometri Uv dengan metode *dual wavelength* yang kemudian didapatkan hasilnya apakah sampel positif atau negatif mengandung asam retinoat maupun hidrokuinon

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel Penelitian ini menggunakan variable bebas dan variabel terikat dimana variabel bebas nya yaitu pada krim malam dan pada variabel terikatnya yaitu spektrofotometri UV dan metode dual wavelenght

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter penelitian ini menggunakan uji laboratorium secara Spektrofotometri UV, meliputi cara pembuatan kurva kalibrasi, penentuan panjang gelombang maksimum dan penentuan kadar.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan februari sampai akhir bulan april 2024.

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

 Pembuatan sampel uji kuantitatif dengan menggunakan alat spektrofotometer UV dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Medan Nusantara Al-Washliyah Medan.

## 3.3 Bahan dan Peralatan

### 3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah baku Hidrokuinon dan Asam Retinoat , krim malam dengan 4 merek dagang yang berbeda yaitu krim malam A, B, C, D, asam asetat anhidrat, natrium sulfat aquadest, Sbcl3(antimony triklorida), etanol 96% FeCl3, kloroform, metanol, HCl 4N.

### 3.3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain erlenmeyer, gelas ukur 20 ml, labu ukur 50ml, labu ukur 10 ml, corong, pipet tetes, plat tetes, neraca analitik,batang pengaduk, perkamen, cawan porselin alumunium foil, beaker glas 100ml, tabung reaksi, rak tabung, bola hisap, Spektrofotometer UV dan kuvet.

## 3.4 Persiapan Bahan

### 3.4.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan secara *PurposiveSampling*  yaitu pada sedian krim malam yang di jual dikota medan.

## 3.5 Prosedur Penelitian dan Penggumpulan Data

### 3.5.1 Analisis Kualitatif Hidrokuinon Pada Sampel Krim Malam

Sebanyak 0,5 gram sampel ditimbang dan ditempatkan di atas plat tetes, lalu ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl3. Sampelyangpositifmengandunghidrokuinonditandaidenganperubahanwarnadarihijausampaihitam(Julan *at al.,* 2023)

### 3.5.2 AnalisisKuantitatif Kadar HidrokuinonDenganMetodeSpektrofotometri UV

#### 3.5.2.1 PembuatanLarutan Baku 1000 mcg/ml Hidrokuinon

Sebanyak 100 mg hidrokuinonditimbang, dilarutkandenganetanol 96% padalabutakar 100 ml, tambahkansampaitandabataslaluhomogenkan, kemudiandiperolehkonsentrasilarutan 1000 mcg/ml (Primadiamanti *at al.,* 2019).

#### 3.5.2.2 Penentuan Seri Larutan Baku Hidrokuinon

Larutanbakuhidrokuinon 1000 mcg/ml diambilsebanyak 10 ml menggunakan pipet volume 10 ml. Lalu masukkan pada labu ukur 100 ml, tambahkan etanol 96% sampai volume 100 ml. Kemudian diperoleh larutan baku hidrokuinon dengan konsentrasi 100 mcg/ml. Setelah itu dibuat larutan baku hidrokuinon seri konsentrasi 7,11,15,19, dan 23 mcg/ml (Primadiamanti *at al*., 2019).

#### 3.5.2.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Hidrokuinon

Diambil 1,5 ml larutan baku hidrokuinon 100 mcg/ml, masukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkanetanol 96% sampaivolumenya 10 ml. Larutandikocokhinggatercampur.Absorbansinyadiukurdenganspektrofotometer UVdenganpanjanggelombang 200-400 nm (Primadiamanti*at al*., 2019).

#### 3.5.2.4 PembuatanKurva Baku Hidrokuinon

Masing-masinglarutanbakuhidrokuinondengankonsentrasi 7,11,15,19, dan 23 mcg/ml diambilsebanyak 0,7, 1,1, 1,5, 1,9, 2,3 ml, masukkankedalamlabuukur 10 ml. Ditambahkanetanol 96% hinggavolumenya 10 ml. Kemudianmasing-masinglarutandiukurabsorbansinyadenganmenggunakanspektrofotometer UVpadapanjanggelombangmaksimum (Primadiamanti*at al*., 2019).

#### 3.5.2.5 Penetapan Kadar HidrokuinonDalamSampel

Masing-masingsampelkrimmalamditimbangsebanyak 0,5 gram, masukkankedalamcawanpenguap 250 ml. Tambahkan 6 tetesHCl 4 N dan 100 ml etanol 96%, panaskan di atas hotplate sambildiaduk. Kemudianhasilpemanasandisaringmenggunakankertassaring yang telahdiisidengan1gram natriumsulfat, masukkanfiltrattersebutkedalamlabuukur 100 mltambahkanetanolsampaitandabatas. Pipet 0,5 ml larutantersebutpadalabutentukur 10 ml kemudiancukupkandenganetanol . Laludiukurabsorbansinya (Primadiamanti*at al*., 2019).

### 3.5.3 AnalisisKualitatifAsamRetinoatPadaSampelkrimmalam

Disiapkantabungreaksi yang bersih, kemudianditimbangdengan 0,5 gram sampel,dan 15 teteskloroform, homogenkan. Selanjutnya, ditambahkan 4 tetesasamasetatanhidrat, laluditambahkan 1 sudip SbCl3kedalamcampurantersebut. Amati perubahanwarna yang terjadi, hasildinyatakanpositifmengandungasamretinoatapabilaterbentukwarnabiru(Pratama *at al.*, 2022).

### 3.5.4AnalisisKuantitatif Kadar AsamRetinoatDenganMetodeSpektrofotometri UV

#### 3.5.4.1 PembuatanLarutan Baku 1000 mcg/ml AsamRetinoat

Di timbangsejumlah 50 mg asamretinoat, masukkandalam beaker glass kemudian di larutkandalam 50 ml pelarutmetanol.Setelahitu, larutantersebutdiencerkan, sehinggadidapatkankonsentrasi 1000 mcg/ml tanda (Wardhani*et al.*, 2019).

#### 3.5.4.2 PembuatanLarutan Baku 500 mcg/ml AsamRetinoat

Mengambil 25 mL larutanasamretinoat 1000 mcg/ml, dimasukkankedalamlabuukur 50 mL, laluditambahkanmetanolsampaigaristanda. Kemudiandiperolehlarutanbakuasamretinoatdengankonsentrasi 500 mcg/ml. Setelahitudibuatlarutanbakuasamretinoatdengankonsentrasi 100, 150,200,250, dan 300 mcg/ml (Wardhani*et al.*, 2019).

#### 3.5.4.3 PenentuanPanjangGelombangMaksimumAsamRetinoat

Dipipet 4 mL larutanasamretinoat 500 mcg/ml dandimasukkankedalamlabuukur 10 mL, laluditambahkanmetanolsampaigaristandadandihomogenkan. Diukurserapanmaksimumpadapanjanggelombang 200-400 nm denganmenggunakanblanko.Blanko yang digunakan adalah metanol (Wardhani *et al*., 2019).

#### 3.5.4.4 Penentuan Linieritas Kurva Kalibrasi

Dipipet dari larutan asam retinoat 500 mcg/ml ke dalam labu ukur 10 mL dengan konsentrasi (100, 150, 200, 250, dan 300 mcg/ml) dan diambil sebanyak (2, 3, 4, 5, 6 ml). Kemudianmasing-masinglabuukurtersebutlaluditambahkanmetanolsampaigaristanda.Dikocokhinggahomogen, kemudiandiukurserapannyapadapanjanggelombangmaksimum yang diperoleh (Wardhani*et al*., 2019).

#### 3.5.4.5Penetapan Kadar AsamRetinoat

Ditimbangsampelsebanyak 0,5 gram,larutkandengan 25 ml metanoldicawanpenguap. Saringlarutanterebutkedalam beaker glass 100 ml. Masukkanfiltrattersebutkedalamlabutentukur 50 ml tambahkanmetanolsampaitandabatas. Pipet 0,5 ml larutantersebutpadalabutentukur 10 ml kemudiancukupkanmetanolhinggatandabatas. Laluukurabsorbansinya(Wardhani et al., 2019).

### 3.5.5 AnalisisKualitatifPadaMetode Dual Wavelenght

#### 3.5.5.1 PembuatanSpektrumSerapanMaksimumHidrokuinon

Dipipet 1,5 ml dari LIB II hidrokuinon, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml dan dicukupkanvolumenya dengan pelarutetanol sampai garis tanda. Dikocok larutan sampai homogen hingga diperoleh larutan hidrokuinon dengan konsentrasi 15 mcg/ml, kemudian diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 200-400nm.

#### 3.5.5.2 PembuatanSpektrumSerapanMaksimumAsamRetinoat

Dipipet 4 ml dari labuLIB II asamretinoat, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml dan dicukupkan volumenyamenggunakan pelarut methanol sampai garis tanda. Dikocok larutan pada labu sampai homogen hingga diperoleh larutan asam retinoat dengan konsentrasi 200 mcg/ml, kemudian larutan pada labu tentukur tersebut diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 200-400nm.

#### 3.5.5.3 PembuatanSpektrumSerapanCampuranHidrokuinondanAsamRetinoat

Campurakan LIB II masing-masingdenganhidrokuinonberbagaikonsentrasi (7; 11; 15; 19; 23 mcg/ml) dipipetsebanyak 0.7 ml, 1.1 ml, 1.5 ml, 1.9 ml, dan 2.3 ml sertadenganasamretinoatberbagaikonsentrasi (100; 150; 200; 250; 300 mcg/ml) dipipetsebanyak 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, dan 6 ml. Lalucukupkandenganpelarutetanolhinggatandabataspadamasing-masinglabutentukur 10 ml. Dan diukurabsorbansinya. kemudian larutan tersebut di ukur serapannya pada rentang panjang gelombang 200-400 nm.

#### 3.5.5.4 PenentuanPanjangGelombangAnalisisHidrokuinondanAsamRetinoatDenganMetode Dual Wavelength

#### 3.5.5.5 Aplikasi Origin

BukaOriginPro, lalumasukkan data hasil extract dalambentuk .csvkedalamkolompadaaplikasiOriginPro. Lakukan berulang kali hingga seluruh data telah dimasukkan. Kemudian berikan label pada masing-masing data. Pada sumbu x diberikan nama “Wavelength” dengan unit nm. Pada sumbu y diberikan nama “Absorbance” dengan unit dikosongkan. Sedangkanpada Comment diberikannama data, contoh “Hidrokuinon 7 mcg/ml”. Setelah data selesaidinamakan, untukmembuat plot digunakanfitur Plot à Basic 2D à Line Plot.Setelah line plot terbentuk, grafikdapatdimodifikasiberbagaiparameternyasepertilebarsumbu x danlebarsumbu y, dll.Padagambarinidibuatlebarnya 240 – 400 nm, dansumbu y nyayaitu -0,25sampai 2,75. Setelahseluruh parameter telahsesuaidengan yang diinginkan, gambardapatdiexportdengancara File à Export Graph, lalupilih open dialog, pada window baru yang muncul, pilihjenistipegambar yang akandibuat, dipilih Portable Network Graphics (\*.png), danpilihdirektoritempatpenyimpanangrafik yang akandiexport.

### 3.5.6 Uji Validasi Metode Presisi,Linieritas,LOD dan LOD

### 3.5.6.1 Presisi

Presisi adalah menunjukkan adanya derajat kesesuaian hasil uji yang dilakukan secara individual, yang merupakan penyebaran hasil uji secara individual dari nilai rata-rata dimana proses analisis dilakukan berulang pada sampel yang berasal dari campuran homogen. Nilai presisi dapat ditentukan dengan membandingkan Relative Standard Deviasion (RSD) dengan syarat keberterimaan Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai % RSD ≤ 2% (Damayanti & Kurniawati, 2017). Presisidapatdihitungdenganrumussepertidibawahini :

 SD = $\sqrt{\sum\_{}^{}\frac{\left(X-\overbar{x}\right)^{2}}{n-1}}$

RSD = $\frac{SD}{\overbar{x}}X 100\%$

#### 3.5.6.2 Linieritas

Linearitasadalahkemampuanmetodeanalisisuntukmemberikanrespon yang secaralangsungataudenganbantuantransformasimatematik yang baik, proporsionalterhadapkonsentrasianalitdalamsampel(Asis *at al*.,2020). Linieritasdiukurmelaluipembuatankurvakalibrasidenganmemplotkannilaiabsorbansiterukur (sumbu y) dengankadarlarutanstandar (sumbu x). Dari persamaan regresi linier yang didapat kemudian dihitung nilai koefisien korelasi (r²).

y = ax + b

Perhitungan Koefisien Korelasi:

r = $\frac{\left(xy\right)-(x)(y)/n}{\sqrt{(\left(x^{2}\right)-\left(x\right)^{2}/n)(\left(y^{2}\right)-\left(y\right)^{2}/n))}}$

Keterangan :

Y = Variabel terikat

X = Variabel bebas

a = Konstanta intersep

b = Slop/kemiringan

r = koefisien korelasi

#### 3.5.6.3 LOD dan LOQ

Setelah mendapatkan kurva kalibrasi yang memenuhi persyaratan analisis, selanjutnya data yang diperoleh dari konsentrasi tiap analit yang memberikan absorbansi berbeda diolah untuk menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ). Limit deteksi (LOD) merupakan parameter uji batas terkecil yang dimiliki oleh suatu alat/instrument untuk mengukur sejumlah analit tertentu. Limit deteksi adalah konsentrasi atau jumlah terkecil/terendah dari analit dalam sampel yang masih menunjukkan nilai serapan atau absorbansi pada alat tanpa harus memenuhi kriteria akurasi dan presisi (Sumarno & Kusumaningtyas, 2018).

Limit kuantitasi (LOQ) merupakan jumlah analit terkecil dalam sampel yang masih dapat diukur dengan akurat dan presisi oleh alat/instrument. Berikut rumus LOD &LOQ :

Batas deteksi ( LOD ) = 3 $\left(\frac{Sy}{X}\right)/ S$lope

Batas kuantifikasi (LOQ) = 10 $\left(\frac{Sy}{X}\right)/ S$lope

Simpangan baku $\left(\frac{Sy}{X}\right)$ = $\sqrt{\sum\_{}^{}\frac{\left(y-yi\right)^{2}}{n-2}}$

Keterangan:

Sy/x = simpangan baku residual

LOD = Limit of detection

LOQ =Batas kuantifikasi