

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah model desain eksperimental. Penelitian eksperimental digunakan untuk memastikan suatu gejala atau akibat yang ditimbulkan oleh suatu faktor atau perlakuan. Dalam hal ini yaitu dengan menggunakan alat Spektrofotometri UV-Vis guna menganalisis kadar vitamin C pada serum pencerah wajah yang tidak terdaftar BPOM.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu

Proses penelitian dilakukan pada periode bulan Desember – Januari 2023.

C. Definisi Operasional

1. Asam askorbat atau vitamin C merupakan senyawa yang mudah larut dalam air dan memiliki fungsi untuk kulit sebagai penangkal dari paparan sinar UV.
2. Serum wajah merupakan serum yang diperoleh dari platform belanja *online* dengan klaim mengandung vitamin C yang dapat mencerahkan kulit wajah dan tidak teregistrasi BPOM.

3. Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode analisis kuantitatif dengan cara pembacaan absorbansi menggunakan panjang gelombang maksimal 263 nm.
4. Validasi metode merupakan metode penilaian terhadap parameter linieritas, presisi, akurasi, LOD dan LOQ.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai jenis sampel serum pencerah wajah.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar vitamin C dalam serum pencerah wajah.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah panjang gelombang maksimum dan *operating time*.

E. Kriteria Sampel

1. Kriteria Inklusi

Sampel yang digunakan sebagai objek pada penelitian ini adalah serum pencerah wajah dengan klaim mengandung vitamin C yang tidak teregistrasi BPOM yang dibeli melalui platform belanja *online*.

2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam pemilihan sampel adalah serum pencerah wajah dengan klaim mengandung vitamin C yang beredar di pasaran yang sudah teregistrasi BPOM.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang dipakai pada penelitian ini diantaranya adalah seperangkat instrumen spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV mini 1800), neraca analitik (Ohaus), dan seperangkat alat gelas (Iwaki).

2. Bahan

Bahan yang dipakai pada penelitian ini diantaranya adalah standar vitamin C (Nitra Kimia), aqua pro injeksi, 5 sampel serum pencerah wajah (A, B, C, D, E), KMNO_4 0,1%.

G. Prosedur Penelitian

1. Uji Organoleptis

Sampel (A, B, C, D, E) masing-masing di uji organoleptis dengan cara mengamati karakteristik sampel yang meliputi warna, bau dan tekstur menggunakan panca indera.

2. Preparasi sampel

Sampel (A, B, C, D, E) masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram kemudian setiap sampel dilarutkan dengan aqua pro injeksi dalam labu ukur 10 mL.

3. Analisis Kualitatif

Vitamin C dalam sampel serum wajah diidentifikasi menggunakan reaksi warna dengan pereaksi KMnO_4 0,1 %. Sebanyak 1 mL larutan KMnO_4 0,1 % ditambahkan ke dalam 1 mL larutan sampel dan larutan baku pembanding sebanyak 1 mL pula, jika mengandung vitamin C maka warna KMnO_4 semula yang hilang pada suhu kamar kemudian berubah menjadi coklat (Higea, 2019).

4. Analisis Kuantitatif

a. Pembuatan larutan standar vitamin C

Larutan standar vitamin C 1000 ppm dibuat dengan menimbang serbuk standar vitamin C 100 mg lalu dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan aqua pro injeksi. Larutan standar diencerkan dengan cara di pipet 5 mL lalu dilarutkan dengan aqua pro injeksi dalam labu ukur 50 mL sehingga menjadi 100 ppm.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan vitamin C

Di pipet larutan standar vitamin C 100 ppm sebanyak 0,8 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan aqua pro injeksi hingga tanda batas (konsentrasi 8 ppm). Larutan diukur menggunakan alat Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm dengan menggunakan larutan blanko aqua pro injeksi.

c. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara di pipet larutan standar vitamin C 100 ppm sebanyak 0,6 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan aqua pro injeksi sampai

tanda batas kemudian dihomogenkan (konsentrasi 6 ppm). Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit dan dilakukan pembacaan absorbansi selama 30 menit.

d. Penentuan kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan memipet larutan standar vitamin C 100 ppm ke dalam labu ukur 10 mL masing - masing sebesar 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, 1 mL, dan 1,2 mL kemudian ditambahkan aqua pro injeksi sampai tanda batas sehingga didapatkan kurva kalibrasi dengan konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Larutan kurva kalibrasi pada konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam kuvet dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan.

5. Validasi Metode

a. Uji Linieritas

Nilai linieritas ditentukan dengan membaca absorbansi larutan standar konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm. Hasil dari pembacaan absorbansi dihitung dari persamaan garis (regresi linier) dan koefisien korelasinya dihitung dengan rumus $y = bx + a$.

Keterangan :

y : Absorbansi sampel

a : Slope

x : Konsentrasi sampel

b : Intersep

b. Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan cara metode pengulangan (repeability) yang dilakukan pada larutan konsentrasi 6 ppm dengan 6 kali pengulangan. Masing–masing diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum, setelah itu dicari rata-rata dari hasil pembacaan absorbansi yang diperoleh. Presisi ditentukan sebagai simpangan baku (SD) dan %RSD. Rumus perhitungan SD menurut (Riyanto, 2014) adalah sebagai berikut.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi-x)^2}{n-2}}$$

Keterangan :

SD : Standar Deviasi

Xi : Konsentrasi sampel

X : Rata-rata absorbansi sampel

N : Jumlah sampel

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai %RSD sebesar 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa. Rumus perhitungan %RSD menurut (Riyanto, 2014) adalah sebagai berikut.

$$\%RSD = \frac{\text{standar deviasi (SD)}}{\text{harga rata-rata (x)}} \times 100\%$$

Keterangan :

X : Kadar rata-rata sampel

SD : Standar Deviasi

RSD : *Relative Standard Deviation*

c. Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan menyiapkan 3 labu ukur 10 mL. Sampel serum yang telah diketahui kadarnya dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan larutan baku masing-masing dengan konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Larutan dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan alat spektrofotometer UV- Vis dengan 3 kali replikasi. Hasil akurasi dapat dihitung dengan memasukkan rumus:

$$Recovery (\%) = \frac{CF - CA}{C * A}$$

Keterangan :

CA : Konsentrasi sampel sebenarnya

CF : Konsentrasi total sampel hasil pengukuran

C*A : Konsentrasi analit yang ditambahkan

d. LOD dan LOQ

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dihitung dari persamaan garis regresi linier kurva kalibrasi yang telah diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$Limit\ of\ Detection\ (LOD) = \frac{3 \times SD}{Slope}$$

$$Limit\ of\ Quantitation\ (LOQ) = \frac{10 \times SD}{Slope}$$

Keterangan :

SD : Standar deviasi (Simpangan baku) respon analitika dari blanko

Slope : Arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap analisis blanko (b pada persamaan garis $y = bx+a$)

6. Penetapan kadar vitamin C dalam sampel

Sampel merupakan serum pencerah wajah yang belum teregristrasi BPOM dan beredar di platform belanja *online*. Penelitian ini menggunakan 5 sampel serum wajah (Sampel A, B, C, D, dan E). Setiap sampel ditimbang 1 gram lalu dilarutkan dalam aqua pro injeksi dalam labu ukur 10 mL untuk dilakukan pembacaan absorbansi sampel. Replikasi dilakukan sebanyak 3 (tiga) kali pengulangan. Konsentrasi sampel kadar asam askorbat dihitung dengan persamaan regresi linier :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y : Absorbansi sampel

a : Slope

x : Konsentrasi sampel

b : Intersep

Untuk mendapatkan kadar % vitamin C dalam sampel dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

C_s = Konsentrasi sampel (%)

C = konsentrasi yang diperoleh dari persamaan regresi kurva kalibrasi

F_p = Faktor pengenceran

W = Bobot sampel (mg)

V = Volume labu ukur (liter)

H. Analisis Data

Untuk menentukan kadar vitamin C di dalam serum pencerah wajah, dilakukan dengan persamaan kurva baku $y = bx + a$ yang dihasilkan oleh seri konsentrasi standar (x) berbanding dengan nilai absorbansi (y). Hasil penelitian yang diperoleh meliputi data hasil linieritas, presisi, akurasi, LOD dan LOQ serta perhitungan penetapan kadar yang kemudian diolah dengan software *Microsoft excel* dan disajikan dalam bentuk tabel maupun grafik yang bertujuan untuk memudahkan dalam menganalisis dan menentukan kesimpulan.