

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini bersifat *experimental laboratories*. Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental design*. Pada penelitian ini, peneliti mengembangkan metode kolorimetri berbasis pencitraan digital dalam pemanfaatan ekstrak kubis ungu sebagai reagen deteksi cepat hidrokuinon yang akan dilakukan validasi metode pengembangan pencitraan digital.

#### **3.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret 2021 di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat**

Pisau, talenan, blender, timbangan digital, *hot plate*, pH meter, termometer, botol gelap, spatula, kaca arloji, pipet tetes, tabung reaksi, penjepit, bola hisap, mikropipet, rak tabung, batang pengaduk, sendok, corong gelas, gelas beaker 50 ml, gelas beaker 300 ml, gelas ukur 50 ml, labu ukur 25 ml, labu ukur 100 ml, pipet ukur 5 ml, pipet ukur 10 ml, pipet volume 1 ml, pipet volume 2 ml, pipet volume 10 ml, Erlenmeyer 250 ml, kamera *smartphone android 7.1 nougat*, dan program *image J*.

##### **3.3.2 Bahan**

Hidrokuinon (USP-*Eastman*), kubis ungu (*Brassica oleraceae var. capitata L.*), aquades, buffer fosfat pH 12 0,1 M, etanol 96 % *analytical grade* (Merck), metanol *technical grade*, kertas saring (whatman), aluminium foil (*best fresh*), dan tip 200 $\mu$ l.

#### **3.4 Variabel Penelitian**

##### **3.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi sehingga timbul variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah jenis pelarut ekstraksi kubis ungu dan konsentrasi larutan hidrokuinon.

### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah faktor yang diobservasi atau yang diukur untuk mengetahui adanya pengaruh variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik validasi metode pengembangan kolorimetri berbasis pencitraan digital dalam deteksi cepat hidrokuinon dari ekstrak kubis ungu meliputi linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, presisi, dan akurasi.

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	Definisi Operasional	Metode	Hasil Ukur	Skala
1.	Hidrokuinon	Hidrokuinon merupakan golongan fenol yang sering ditemukan pada kosmetik. Penggunaannya hanya diperbolehkan pada kuku artificial sebesar 0,02% dan pewarna rambut maksimal 0,3%.	Analisis menggunakan deteksi cepat berdasarkan metode kolorimetri berbasis pencitraan digital	Kadar hidrokuinon	Rasio
2.	Pencitraan Digital	Pengolahan atau analisis citra digital sehingga	Hasil foto dianalisis menggunakan	Nilai intensitas warna RGB	Interval

		menghasilkan informasi yang dapat dipahami manusia. Citra digital adalah representasi dan fungsi intensitas cahaya pada bidang dua dimensi	program <i>image J</i> menghasilkan data intensitas cahaya komponen warna RGB kemudian dikonversi menjadi absorbansi menggunakan persamaan lambert-Beer	yang akan dikonversi menjadi absorbansi sehingga diperoleh persamaan regresi linier untuk mencari kadar	
3.	Optimasi jenis pelarut ekstrak antosiani	Uji yang dilakukan untuk mengetahui jenis pelarut yang mampu mengekstrak antosianin dari kubis ungu secara maksimal sebagai indikator pada uji hidrokuinon secara pencitraan digital	Jenis pelarut yang dapat menghasilkan ekstrak antosianin yang memberikan perbandingan intensitas warna maksimum antara kontrol positif dengan kontrol negatif akan terpilih sebagai pelarut ekstrak antosianin sebagai indikator	Nilai Intensitas Warna RGB	Rasio

			analisis hidrokuinon secara pencitraan digital		
4.	Uji validasi metode	Uji yang dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut dapat sesuai peruntukannya	Pengujian linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi metode.	Koefisien korelasi (r), nilai LOD, nilai LOQ, % RSD, dan % recovery.	Rasio dan Ordinal

### 3.6 Metode Penelitian

#### 3.6.1 Ekstraksi Kubis Ungu

- **Ekstraksi Menggunakan Pelarut Etanol 96%**

Kubis ungu dikupas kulit terluarnya dan dicuci bersih menggunakan air mengalir. Selanjutnya kubis ungu diiris tipis-tipis dan di haluskan menggunakan blender. Kubis ungu yang telah halus ditimbang sebanyak 10 gram dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 100 ml untuk dimaserasi dalam Erlenmeyer 250 ml. Proses maserasi dilakukan selama 45 menit. Ekstrak yang didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ditampung dalam wadah gelap.

- **Ekstraksi Menggunakan Pelarut Aquades**

Kubis ungu dikupas kulit terluarnya dan dicuci bersih menggunakan air mengalir. Selanjutnya kubis ungu diiris tipis-tipis dan di haluskan menggunakan blender. Kubis ungu yang telah halus ditimbang sebanyak 10 gram dan ditambahkan aquades hangat (60 °C) sebanyak 100 ml untuk dimaserasi dalam erlenmeyer 250 ml. Proses maserasi dilakukan selama 45 menit. Ekstrak yang didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ditampung dalam wadah gelap.

### 3.6.2 Optimasi Perbandingan Jenis Pelarut Ekstrak Antosianin Kubis Ungu Sebagai Pereaksi Hidrokuinon

- **Pembuatan Larutan Induk Hidrokuinon 5%**

Dibuat larutan baku induk hidrokuinon 5% dengan menimbang 5000 mg hidrokuinon dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Pembuatan Larutan Standar Hidrokuinon 2%**

Dibuat larutan baku hidrokuinon 2% dengan memipet 10 ml larutan induk hidrokuinon 5% dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Analisis Hidrokuinon dengan Ekstrak Antosianin**

Pada 2 tabung reaksi yang telah disiapkan dimasukkan ekstrak kubis ungu hasil maserasi dengan pelarut etanol 96% masing-masing sebanyak 3 mL. Selanjutnya ditambahkan 2 ml buffer fosfat pH 12. Kemudian pada tabung 2 ditambahkan 3 ml larutan standar hidrokuinon 2%. Tabung 1 sebagai kontrol negatif dan tabung 2 sebagai kontrol positif. Dikocok dan diamati perubahan warna larutan. Selanjutnya difoto menggunakan kamera *smartphone* dan hasil foto diolah menggunakan aplikasi *Image J*.

Pada 2 tabung reaksi yang telah disiapkan dimasukkan ekstrak kubis ungu hasil maserasi dengan pelarut aquades masing-masing sebanyak 3 mL. Selanjutnya ditambahkan 2 ml buffer fosfat pH 12. Kemudian pada tabung 2 ditambahkan 3 ml larutan standar hidrokuinon 2%. Tabung 1 sebagai kontrol negatif dan tabung 2 sebagai kontrol positif. Dikocok dan diamati perubahan warna larutan. Selanjutnya difoto menggunakan kamera *smartphone*. Hasil foto diolah menggunakan aplikasi *Image J*. Jenis pelarut dengan hasil intensitas optimum selanjutnya akan digunakan pada pengujian validasi metode pencitraan digital deteksi cepat hidrokuinon.

### 3.6.3 Linieritas, Batas Deteksi, dan Batas Kuantitasi

- **Pembuatan Larutan Standar Hidrokuinon 0,02% - 5%**

Dibuat Larutan baku induk hidrokuinon 5% dengan menimbang 5000 mg hidrokuinon dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label. Kemudian dibuat larutan baku kerja hidrokuinon seperti pada Tabel 3.1

**Tabel 3.2 Larutan Standar Kerja**

<b>Konsentrasi larutan yang diambil (ppm)</b>	<b>Jumlah larutan yang diambil (ml)</b>	<b>Volume labu ukur</b>	<b>Konsentrasi larutan (ppm)</b>
50000	15	25	30000
50000	10	25	20000
50000	5	25	10000
50000	2,5	25	5000
50000	1,5	25	3000
50000	1	25	2000
50000	0,5	25	1000
10000	1,75	25	700
10000	1,25	25	500
10000	0,5	25	200

- **Pengujian Linieritas, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi**

Penentuan linieritas dilakukan dengan cara pada 12 tabung reaksi yang telah disiapkan ditetesi 3 ml ekstrak kubis ungu dengan pelarut terpilih dan ditambah 2 ml

buffer fosfat pH 12. Tabung 1 merupakan larutan blanko. Selanjutnya pada tabung ke 2 sampai ke 12 ditambahkan larutan standar kerja hidrokuinon dengan variasi konsentrasi 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,07%, 0,05%, dan 0,02% masing-masing sebanyak 3 ml. Dikocok dan diamati perubahan warna larutan dari biru menjadi hijau kecoklatan. Selanjutnya difoto menggunakan kamera *smartphone*. Hasil foto diolah menggunakan aplikasi *Image J*. Data yang diperoleh pada pengujian linieritas selanjutnya dianalisis menggunakan program *Microsoft Excel* sehingga diperoleh kurva linieritas antara konsentrasi dengan absorbansi. Selain itu, dari hasil analisis akan diperoleh nilai  $X_p$ .  $X_p$  ini menunjukkan nilai batas deteksi yang dihitung dari persamaan regresi (Wulandari *et al*, 2012). Sedangkan batas kuantitasi dapat dihitung dengan persamaan 2.1

#### 3.6.4 Presisi

- **Pembuatan Larutan Induk Hidrokuinon 5%**

Dibuat Larutan baku induk hidrokuinon 5% dengan menimbang 5000 mg hidrokuinon dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Pengujian Presisi**

Penentuan presisi dapat ditentukan dengan menghitung standar deviasi relative (RSD) dari 3 kali pengujian. Pada 5 tabung reaksi yang telah disiapkan ditetesi 3 ml ekstrak kubis ungu dengan pelarut terpilih dan ditambah 2 ml buffer fosfat pH 12. Selanjutnya dicampurkan larutan standar hidrokuinon 5 %. Dikocok dan diamati perubahan warna larutan dari biru menjadi hijau kecoklatan. Warna yang terbentuk kemudian difoto menggunakan kamera *smartphone*. Hasil foto diolah menggunakan aplikasi *Image J*. Kemudian dihitung nilai standar deviasi (SD) dan standar deviasi relative (RSD) dengan program *Microsoft Excel*.

### 3.6.5 Akurasi

- **Pembuatan Larutan Induk Hidrokuinon 5%**

Dibuat Larutan baku induk hidrokuinon 5% dengan menimbang 5000 mg hidrokuinon dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Pembuatan Larutan Standar Hidrokuinon 2%**

Dibuat Larutan baku hidrokuinon 2% dengan memipet 10 ml larutan induk hidrokuinon 5% dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Pembuatan Larutan Standar Hidrokuinon 1%**

Dibuat Larutan baku hidrokuinon 2% dengan memipet 5 ml larutan induk hidrokuinon 5% dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Pembuatan Larutan Standar Hidrokuinon 0,3%**

Dibuat Larutan baku hidrokuinon 3% dengan memipet 1,5 ml larutan induk hidrokuinon 5% dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Pembuatan Larutan Standar Hidrokuinon 0,02%**

Dibuat Larutan baku hidrokuinon 0,02% dengan memipet 0,5 ml larutan induk hidrokuinon 1% dengan seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan sedikit pelarut metanol hingga larut sempurna. Selanjutnya ditanda bataskan dengan metanol dan dikocok hingga homogen serta diberi label.

- **Pengujian Akurasi**

Penentuan akurasi dilakukan dengan menghitung % *recovery* dari tiap pengulangan pengukuran sampel yang diketahui mengandung hidrokuinon dengan kadar yang tetara. Penambahan larutan standar konsentrasi 0,02 %; 0,3%; dan 2%

dilakukan dengan 3 kali pengujian. Pengujian dilakukan dengan cara pada 4 tabung reaksi yang telah disiapkan dimasukkan 3 ml ekstrak kubis ungu dengan pelarut terpilih dan ditambah 2 ml buffer fosfat pH 12. Pada tabung kedua ditambahkan larutan standar hidrokuinon 0,02%, pada tabung ketiga ditambahkan larutan standar hidrokuinon 0,3%, dan pada tabung keempat ditambahkan larutan standar hidrokuinon 2%. Dikocok dan diamati perubahan warna larutan dari biru menjadi hijau kecoklatan. Data diukur menggunakan program *image J* sehingga akan diperoleh nilai mean RGB dan dihitung nilai % *recovery*.

### 3.7 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

Pengukuran dengan pencitraan digital akan diperoleh data intensitas cahaya komponen RGB. Selanjutnya mengkonversi data intensitas menjadi absorbansi menggunakan persamaan Lambert-Beer dengan persamaan berikut :

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

A = Absorbansi

$I_0$  = Intensitas cahaya warna larutan blanko

I = Intensitas cahaya warna komponen warna RGB sampel

Berdasarkan pengolahan data tersebut, data kemudian disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Selanjutnya data absorbansi dibuat kurva kalibrasi untuk mengetahui kadar hidrokuinon yang didapat dari pencitraan digital. Hasil pengujian dengan metode kolorimetri berbasis pencitraan digital dilakukan validasi meliputi parameter linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi dan batas kuantitasi. Dari uji linieritas didapatkan persamaan sebagai berikut :

$$y = ax + b$$

Keterangan :

y = nilai absorbansi

x = kadar hidrokuinon

a = slope

b = intersep

Kriteria nilai linieritas yang baik apabila nilai r mendekati +1 atau -1 dan hasil *p value* kurang dari  $\alpha$  (0,01).

Dari uji batas deteksi dan batas kuantitas dapat ditentukan dengan persamaan sebagai berikut.

$$LOQ = \frac{10 \times LOQ}{3} \dots \dots \dots (a)$$

Dari uji presisi didapatkan nilai standar deviasi (s), baik standar deviasi relatif (RSD) maupun koefisien variasi (KV). Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan nilai RSD 2% atau untuk konsentrasi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.1 Penentuan parameter presisi dapat ditentungan dengan persamaan berikut.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(Ix - x)^2}{n - 1}} \dots \dots \dots (b)$$

$$CV = \frac{SD}{x} \times 100\% \dots \dots \dots (c)$$

Keterangan :

SD = standar deviasi

X = sinyal rata-rata sampel

CV = koefisien variasi

Dari uji akurasi didapatkan % *recovery* yang diperoleh dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% recovery = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a : konsentrasi yang didapat

b : konsentrasi sebenarnya

metode pengembangan memiliki nilai akurasi yang tinggi jika memiliki % *recovery* pada rentang 80% – 110% ataupun termasuk dalam kriteria penerimaan % *recovery* terhadap konsentrasi analit dalam sampel pada Tabel 2.2.