

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Analisis Natrium Diklofenak yang terkandung dalam Jamu Pegal Linu yang dijual di Kabupaten Semarang dilakukan dengan metode eksperimental laboratorium yang secara deskriptif menggambarkan hasil penelitian berdasarkan data yang didapatkan. Metode penelitian terdiri dari uji organoleptis, analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Uji Organoleptis dilakukan dengan cara mencicipi rasa, mencium bau, melihat warna dan meraba bentuk sediaan sampel Jamu Pegal Linu. Analisis kualitatif dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan analisis kuantitatif dilakukan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis untuk memperoleh hasil ada atau tidaknya Bahan Kimia Obat yang terkandung dalam Jamu Pegal Linu.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi

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

##### 2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai Juli dari penyusunan proposal sampai dengan penyusunan laporan.

#### **C. Objek Penelitian**

Penelitian ini menggunakan objek kadar Natrium Diklofenak dalam Jamu Pegal Linu dengan berbagai macam merk.

#### **D. Subyek Penelitian**

##### 1. Populasi

Penelitian ini menggunakan populasi sampel Sampel Jamu Pegal Linu yang dijual di Kabupaten Semarang.

##### 2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 10 jenis sampel Jamu Pegal Linu dari berbagai merk yang dipilih menjadi 5 sampel dan diambil secara acak dari beberapa toko yang ada di Kabupaten Semarang menggunakan teknik *Random Sampling*.

Kriteria sampel yang digunakan meliputi kriteria inklusi dan eksklus. Adapun kriteria yang dimaksudkan adalah sebagai berikut :

##### a. Kriteria Inklusi

- 1) Jamu Pegal Linu dalam bentuk serbuk dan kapsul.
- 2) Jamu Pegal Linu yang memiliki nomor registrasi tetapi tidak terdaftar di BPOM.

##### b. Kriteria Eksklus

- 1) Jamu Pegal Linu dalam bentuk tablet dan sirup
- 2) Jamu Pegal Linu yang memiliki nomor registrasi dan terdaftar di BPOM.

#### **E. Variabel Penelitian**

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan adalah jamu Pegal Linu merk A, B, C, D, E.

##### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan adalah kadar Natrium Diklofenak.

### 3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol yang digunakan adalah banyaknya sampel, kekuatan atau volume alat, perbandingan eluen, dan panjang gelombang Spektrofotometri UV-Vis yang digunakan.

## **F. Defenisi Operasional**

1. Jamu Pegal Linu merupakan salah satu produk obat tradisional yang banyak diminati oleh masyarakat. Jamu Pegal Linu ini diyakini dapat menghilangkan capek-capek, nyeri otot dan tulang, memperlancar peredaran darah, memperkuat daya tahan tubuh dan menghilangkan sakit seluruh badan.
2. Bahan Kimia Obat merupakan produk kimiawi atau senyawa sintetis yang banyak ditemukan pada bahan alam dan biasanya diindikasikan untuk mengobati penyakit.
3. Natrium Diklofenak merupakan derivat asam fenil asetat dan termasuk dalam golongan anti inflamasi non steroid (AINS).
4. Analisis Kualitatif adalah teknik untuk menggambarkan dan meringkas berbagai kondisi dan situasi dari berbagai data yang telah dikumpulkan. Tujuannya adalah untuk mengetahui ada atau tidaknya suatu zat atau senyawa yang terdapat dalam sampel.
5. Analisis Kuantitatif adalah teknik untuk menganalisis data berupa angka menggunakan berbagai teknik statistik. Tujuannya adalah untuk menentukan berapa jumlah zat atau senyawa yang terdapat dalam sampel.

## **G. Pengumpulan Data**

Data yang digunakan diperoleh dengan menganalisis Natrium Diklofenak pada Jamu Pegal Linu yang dilakukan di laboratorium dengan metode Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri UV-Vis. Prinsip yang digunakan adalah analisis kualitatif Natrium Diklofenak menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri UV-Vis berdasarkan nilai Rf dan panjang gelombang maksimal.

## **H. Alat dan Bahan**

### **1. Alat Penelitian**

Penelitian ini menggunakan alat : Bejana kromatografi, Labu ukur 10 ml dan 50 ml (Iwaki), *Beaker glass* 100 ml (Iwaki), Erlenmeyer (Iwaki), Gelas ukur (Iwaki), Corong kaca (Iwaki), Lempeng KLT (silika gel GF<sub>254</sub>) (Merck), Kertas saring (Whatman), Pipa kapiler, Cawan porselin, Penangas air, Tabung reaksi (Iwaki), Rak tabung reaksi, Batang pengaduk, Spatula, Pinset, Penjepit kayu, Pipet tetes, Pipet volume (Pyrex), Palius ball, Neraca analitik, Lampu sinar UV 254 nm dan Spektrofotometri Uv-Vis (Shimadzu UV-1800).

### **2. Bahan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan bahan : Jamu Pegal Linu, Baku pembanding Natrium Diklofenak (BPFI), Etil asetat (Merck), Heksana (Merck), Etanol 96% (Merck) dan Aquadest (Teknis).

## **I. Prosedur Kerja (Rosyada et al., 2019)**

### **1. Uji Organoleptis Sampel Jamu Pegal Linu**

Bentuk, warna, dan rasa diuji pada masing-masing sampel Jamu Pegal Linu.

## 2. Pembuatan Larutan Baku Natrium Diklofenak

Sebanyak 10 mg baku standar Natrium Diklofenak ditimbang menggunakan timbangan analitik lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut etanol 96% setelah itu dicukupkan sampai tanda batas, ditutup dan dikocok hingga homogen.

## 3. Pembuatan Larutan Uji (Preparasi Sampel A, B, C, D, dan E).

Sebanyak 25 mg sampel Jamu Pegal Linu ditimbang menggunakan timbangan analitik lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan 15 ml pelarut etanol 96%, dikocok hingga homogen, kemudian disaring ke dalam gelas beaker. Setelah itu dituang ke dalam cawan porselin. Percobaan diulangi sebanyak 5 kali. Filtrat diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 90°C selama 10 menit. Diangkat dari *waterbath*. Setelah itu dimasukkan ke dalam vial dan ditutup rapat agar tidak menguap.

## 4. Persiapan dan Pembuatan Fase gerak dan Fase diam

### a. Fase Gerak

Fase Gerak dibuat menggunakan beberapa perbandingan antara Etil Asetat dan N-Heksan.

### b. Penjenuhan dengan Kertas Saring

*Chamber* yang akan digunakan dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu. Penjenuhan fase gerak dilakukan dengan meletakkan kertas saring pada salah satu sisi dinding *chamber* yang sudah terisi dengan fase gerak. Salah satu bagian kertas saring harus selalu tercelup di dalam fase gerak. *Chamber* harus tertutup rapat dan tidak boleh digeser

penempatannya. Kertas saring didiamkan hingga fase gerak terelusi naik atau sampai semua permukaan kertas saring basah. Penjenuhan bejana diperlukan untuk memperoleh pemisahan yang baik.

c. Fase Diam

Diperhatikan kondisi Silika Gel GF<sub>254</sub>. Silika Gel GF<sub>254</sub> tidak boleh disentuh bagian permukaan yang berwarna putihnya. Silika Gel GF<sub>254</sub> kemudian diberi garis pensil yang ditandai batas dari bawah diberi jarak 1 cm, jarak perambatan eluen 8 cm, dan batas dari atas diberi jarak 1 cm. Untuk tempat penotolan larutan uji diberikan skala masing-masing 1 cm.

a. Optimasi Fase Gerak

Digunakan beberapa perbandingan fase gerak antara Etil Asetat dan N-Heksan. Diantaranya 15:35, 30:20, dan 25:25.

b. Pembuatan Simulasi Sampel

Simulasi sampel terdiri dari kontrol positif dan negatif. Kontrol Negatif dibuat dengan menimbang 25 mg matriks jamu pegal linu kemudian dituang ke dalam gelas beaker lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 15 ml, diaduk dengan batang pengaduk kemudian disaring ke dalam cawan porselin. Filtrat diuapkan di atas waterbath pada suhu 90°C selama 10 menit, kemudian diangkat dari waterbath. Setelah itu dimasukkan ke dalam vial dan ditutup rapat agar tidak menguap. Kontrol Positif dibuat sama seperti Kontrol Negatif, hanya saja ditambahkan dengan Natrium Diklofenak sebanyak 1 mg.

5. Analisis Kualitatif dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

- a. Dituang 50 ml fase gerak Etil Asetat : N-Heksan (25:25) pada *chamber* yang telah dibersihkan. Fase gerak dijenuhkan dengan meletakkan kertas saring didalam *Chamber*. *Chamber* harus tertutup rapat dan tidak boleh digeser penempatannya. Kertas saring didiamkan hingga jenuh yang ditandai dengan fase gerak terelusi naik sampai ujung kertas saring atau sampai semua kertas saring basah semua.
- b. Disiapkan Silika Gel GF<sub>254</sub> yang akan digunakan.
- c. Pipa kapiler yang akan digunakan untuk penotolan terlebih dahulu dibersihkan menggunakan pelarut etanol 96%.
- d. Larutan standar Natrium Diklofenak ditotolkan secara tegak lurus pada garis yang telah ditandai dengan jarak 1 cm dari tepi samping plat menggunakan pipa kapiler yang sudah dibersihkan menggunakan etanol.
- e. Sampel A, B, C, D, dan E yang sudah dipekatkan kemudian ditotolkan secara tegak lurus dengan jarak 1 cm disebelah totolan baku pembanding menggunakan pipa kapiler yang sudah dibersihkan menggunakan etanol.
- f. Silika Gel GF<sub>254</sub> dimasukkan ke dalam *chamber* yang sebelumnya sudah dijenuhkan dengan fase gerak, setelah itu *chamber* ditutup rapat dan dibiarkan beberapa saat sampai lempeng KLT terelusi sempurna hingga batas yang sudah ditandai.

- g. Silika Gel GF<sub>254</sub> diangkat dengan menggunakan pinset kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.
- h. Silika Gel GF<sub>254</sub> diletakkan dibawah lampu sinar UV 254 nm untuk mengamati penampakan noda yang dihasilkan.
- i. Nilai Rf dihitung untuk masing-masing noda.
- j. Nilai Rf sampel yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan nilai Rf baku pembanding Natrium Diklofenak.

6. Analisis Kuantitatif Natrium diklofenak dengan Spektrofotometri UV-Vis

a. Pembuatan Larutan Baku Natrium Diklofenak 1000 ppm

Sebanyak 50 mg standar Natrium Diklofenak ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas beaker kemudian dicampurkan dengan aquadest 50 ml, setelah itu diaduk menggunakan batang pengaduk hingga larut. Setelah larut, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas sehingga terbentuk larutan Natrium Diklofenak 1000 ppm.

b. Pembuatan Larutan Baku 100 ppm

Sebanyak 1 ml larutan Natrium Diklofenak 1000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas. Larutan natrium diklofenak 100 ppm ini akan dijadikan sebagai larutan stok.

c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebanyak 2 ml larutan stok dipipet ke dalam labu ukur 10 ml, dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai tanda batas. Larutan yang

terbentuk adalah larutan natrium diklofenak 20 ppm. Larutan ini diukur serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm untuk mengetahui panjang gelombang maksimum.

d. Penentuan *Operating Time*

Natrium Diklofenak 20 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang maksimal 275 nm selama 30 menit. Serapan yang tetap dicatat dan digunakan sebagai ukuran waktu pembacaan absorbansi pada pembuatan kurva baku dan penetapan kadar sampel.

e. Pembuatan Kurva Baku

Sebanyak 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 dan 3 ml larutan stok dipipet ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambah etanol 96% hingga tanda batas. Larutan tersebut dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum 275 nm.

f. Penetapan Kadar dan Pembacaan Serapan Sampel

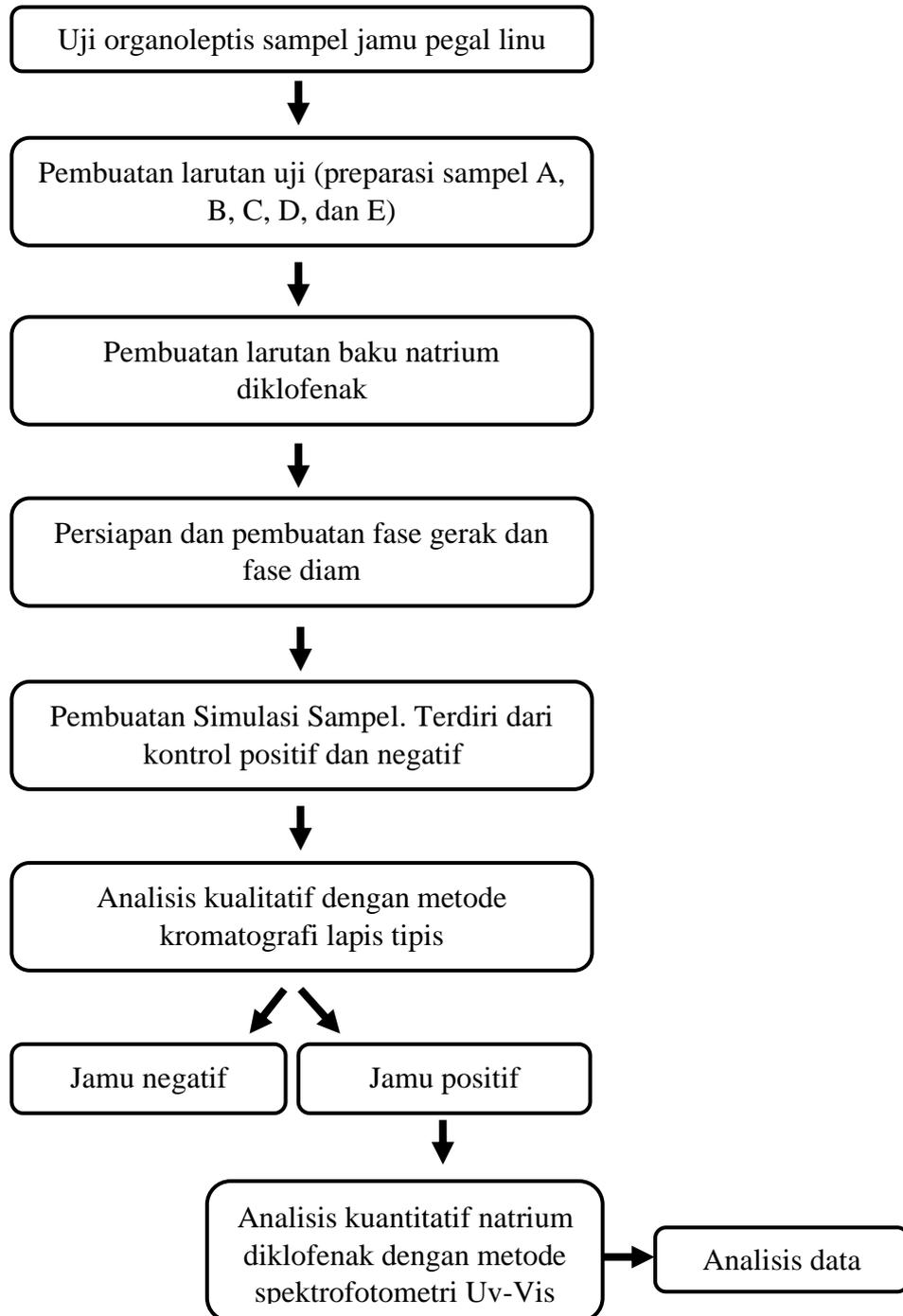
Sampel Jamu Pegal Linu yang mengandung BKO yaitu sampel B, D, dan E masing-masing ditimbang 25 mg, dituang ke dalam gelas beaker dan ditambahkan etanol 96%, diaduk hingga larut menggunakan batang pengaduk. Masing-masing larutan kemudian disaring lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol 96% sampai tanda batas. Sebanyak 2 ml larutan sampel B, D dan E dipipet ke dalam labu ukur 50 ml dan dicukupkan dengan aquadest sampai batas. Absorbansi larutan sampel diukur pada Spektrofotometri UV-Vis sesuai dengan panjang gelombang yang telah ditentukan. Setelah

diukur, absorbansi yang didapatkan pada sampel B terlalu besar sedangkan pada sampel D dan E absorbansinya terlalu kecil sehingga dilakukan pengenceran kembali pada ketiga sampel tersebut. Sebanyak 1 ml larutan sampel B dipipet ke dalam labu ukur 50 ml dan dicukupkan dengan aquadest sampai batas tanda. Sebanyak 4 ml larutan sampel D dan E dipipet ke dalam labu ukur 50 ml dan dicukupkan dengan aquadest sampai batas tanda. Absorbansi larutan sampel diukur pada Spektrofotometri UV-Vis sesuai dengan panjang gelombang yang telah ditentukan. Data absorbansi yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku untuk mendapatkan kadar Natrium Diklofenak dalam sampel Jamu Pegal Linu.

#### 7. Analisis Data

- a. Uji kualitatif dilakukan berdasarkan hasil nilai  $R_f$  yang diperoleh ( $R_f$  sampel dan  $R_f$  larutan baku). Sampel jamu dikatakan mengandung BKO jika  $R_f$  sampel sama dengan  $R_f$  baku yaitu antara 0,2 sampai 0,8.
- b. Uji kuantitatif dilakukan berdasarkan kurva baku dengan pencarian persamaan regresi linier. Regresi linier yang didapatkan yaitu  $y = 0,0245x + 0,0989$  dengan nilai  $r = 0,9994$ . Nilai  $y$  merupakan absorbansi,  $b$  adalah intersep atau *intercept*,  $x$  adalah konsentrasi analit, dan  $a$  adalah kemiringan atau *slope*. Kemudian data absorbansi yang diperoleh dimasukkan dalam rumus sehingga didapatkan nilai  $x$  yaitu kadar BKO dalam sampel jamu pegal linu.

## J. Skema Cara Kerja



Gambar 3. 1 Skema Cara Kerja