

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium dari bulan Desember 2022 sampai bulan Januari 2023 di Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi di Universitas Ngudi Waluyo Semarang dengan uji penelitian secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui apakah sampel jamu pegal linu mengandung bahan kimia obat asam mefenamat atau tidak. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui berapa besar kandungan asam mefenamat yang terdapat pada sampel jamu pegal linu yang beredar di Kabupaten Semarang.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi di Universitas Ngudi Waluyo Semarang.

C. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan populasi sampel jamu pegal linu yang beredar di Kabupaten Semarang. Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *insidental sampling*. Teknik *insidental sampling* yaitu penentuan sampel berdasarkan kebetulan. Di daerah Ungaran diambil 3 sampel dari toko dan pasar yang ditemui, daerah Bergas

diambil 1 sampel dan di daerah Genuk 1 sampel, sehingga ada 5 jenis jamu pegal linu yang digunakan sebagai sampel.

Adapun kriteria dalam penelitian ini sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi adalah karakteristik umum subjek penelitian pada populasi. Adapun kriteria inklusi dalam penelitian ini yaitu:

- 1) Jamu pegal linu yang tidak terdaftar nomor registrasi BPOM yang beredar di Kabupaten Semarang.

b. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi adalah kriteria anggota populasi yang tidak dapat atau tidak terpenuhi sebagai sampel. Adapun kriteria eksklusi dalam penelitian ini yaitu:

- 1) Jamu pegal linu dari produsen jamu termmodern atau diproduksi dipabrik besar.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional adalah definisi yang membuat variabel-variabel yang akan atau yang sedang diteliti menjadi memiliki sifat operasional Pada kaitannya dengan proses pengukuran variabel-variabel tersebut.

1. Jamu pegal linu merupakan jenis obat tradisional yang banyak di konsumsi oleh masyarakat Indonesia dan di percaya memiliki khasiat mengurangi rasa pegal dan linu-linu dan sering ditemukan mengandung bahan kimia obat.

2. Asam mefenamat adalah obat golongan anti-inflamasi non-steroid dan analgesik (NSAID) yang digunakan untuk mengobati rasa sakit ringan hingga sedang yang sering ditambahkan pada jamu pegal linu.
3. KLT merupakan teknik yang dilakukan untuk analisis kualitatif untuk mendeteksi suatu senyawa pada sampel yang dengan melakukan pemisahan campuran asam mefenamat dalam jamu pegal linu.
4. Spektrofotometer UV-Vis merupakan sebuah alat atau instrumen di laboratorium penelitian yang digunakan untuk kuantitatif kadar asam mefenamat dalam jamu pegal linu pada panjang gelombang tertentu.
5. Validasi metode adalah proses untuk memastikan bahwa prosedur yang atau alat yang digunakan memenuhi standar untuk penetapan kadar kadar asam mefenamat pada jamu pegal linu.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang menjadi sebab perubahan atau yang mempengaruhi atau menjadi sebab timbulnya suatu variabel terikat (dependen). Variabel bebas dalam penelitian yaitu 5 sampel jamu pegal linu yang beredar di Kabupaten Semarang.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu kandungan asam mefenamat dan kadar

asam mefenamat dalam jamu pegal linu yang tidak memiliki nomor registrasi BPOM, serta validasi metode.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali merupakan variabel yang mempengaruhi hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah fase gerak, *operating time*, panjang gelombang maksimum dan data kurva kalibrasi.

F. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah bejana kromatografi, labu ukur 10 ml dan 50 ml (Iwaki), *beaker glas*, (Iwaki), gelas ukur (Iwaki), corong kaca (Iwaki), lempeng KLT (silika gel GF254) (Merck), kertas saring (*whatman*), pipa kapiler, cawan porselin, penangas air, tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi, pinset, penjepit kayu, pipet ukur, *vortex mixer*, kuvet, pipet tetes, pipet volume (Pyrex), mikro pepet, batang pengaduk, spatula, timbangan analitik, dan *filler, chamber*, Spektrofometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800).

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Kimia

Baku asam mefenamat, metanol pro-analis, etil asetat pro-analis, amonia, dan aquadest.

b. Bahan Uji

Bahan-bahan yang digunakan adalah 5 sampel jamu pegal linu yang tidak terdaftar nomor registrasi BPOM yang diperoleh dari beberapa toko jamu yang beredar di Kabupaten Semarang.

G. Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang dilakukan dalam penelitian ini adalah metode *insidental sampling*. Pengambilan sampel pada penelitian ini diawali melakukan observasi di beberapa toko dan pasar di Kabupaten Semarang. Total sampel yang dipilih adalah 5 jenis jamu dengan berbagai merek yang berbeda dan tidak terdaftar di registrasi BPOM.

H. Prosedur Penelitian

1. Uji Organoleptis Sampel Jamu Pegal Linu

Uji bentuk, rasa, bau dan warna pada masing-masing sampel Jamu Pegal Linu (Padanun & Minarsih, 2021).

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

Sebanyak 50 mg sampel jamu pegal linu ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukkan kedalam enlemeyer, tambahkan pelarut metanol sebanyak 15 ml, kocok hingga homogen, selanjutnya di saring ke dalam *beaker glas*, setelah itu di tuang ke dalam cawan porselin. Filtrat yang telah disaring diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 90 °C selama 10 menit. Angkat dari *waterbath*. Setelah itu masukkan ke dalam vial dan tutup dengan rapat agar tidak menguap (Padanun & Minarsih, 2021).

3. Pembuatan Larutan Baku Asam Mefenamat 1000 ppm

Sebanyak 50 mg baku standar asam mefenamat ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol setelah itu di cukupkan sampai dengan tanda batas, tutup dan dikocok hingga homogen (Padanun & Minarsih, 2021).

4. Persiapan dan Pembuatan Fase gerak dan Fase diam

a. Fase Gerak

Fase gerak dibuat dengan menggunakan perbandingan antara etil asetat:metanol:amonia (8:1:1) (Rusmalina *et al.*, 2020).

b. Penjenuhan dengan Kertas Saring

Chamber yang akan digunakan dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu. Penjenuhan fase gerak dilakukan dengan cara 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 benjana diperlukan untuk memperoleh pemisahan yang baik (Padanun & Minarsih, 2021).

c. Fase Diam

Perhatikan kondisi Silika Gel GF₂₅₄. Silika Gel GF₂₅₄ tidak boleh di sentuh bagian permukaan yang berwarna putihnya. Silika Gel

GF₂₅₄ selanjutnya di beri 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 diberi skala masing-masing 1 cm (Padanun & Minarsih, 2021).

d. Pembuatan Kontrol Positif dan Negatif

Matriks jamu yang digunakan untuk pembuatan control positif dan control negatif merupakan salah satu produk jamu yang yang didapatkan dari produsen jamu termmodern dengan pemasaran terbesar di Indonesia yang sudah terjamin keamanannya dan sudah terdaftar di BPOM. Kontrol negatif dibuat dengan cara menimbang 50 mg matriks jamu pegal linu lalu tuang ke dalam beaker glass kemudian tambahkan 15 ml pelarut metanol, di aduk dengan menggunakan batang pengaduk setelah itu disaring ke dalam cawan porselin. Filtrat diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 90°C selama 10 menit, setelah itu diangkat dari *waterbath*. selanjutnya dimasukkan ke dalam sosial dan ditutup rapat agar tidak menguap. Kontrol positif dibuat sama seperti pembuatan kontrol negatif, hanya saja ditambahkan dengan asam mefenamat 2 mg (Padanun & Minarsih, 2021).

5. Analisis Kualitatif (KLT)

Baku asam mefenamat, kontrol positif, kontrol negatif dan larutan uji ditotolkan pada plat KLT. Selanjutnya dimasukkan kedalam *chamber* yang berisi fase gerak campuran etil asetat:metanol:amonia (8:1:1) yang sebelumnya telah dijenuhkan terlebih dahulu dengan menggunakan kertas

saring. Plat KLT yang telah sampai batas atas dikeluarkan dari *chamber* dan biarkan fase gerak menguap terlebih dahulu. Amati bercak noda pada lempeng KLT dengan menggunakan lampu sinar UV (ultraviolet) 254 nm dan dihitung nilai Rf (*Retardation faktor*). Nilai Rf dari larutan uji dibandingkan dengan nilai Rf dari larutan asam mefenamat (Padanun & Minarsih, 2021).

6. Validasi Metode

a. Pembuatan Larutan Baku 1000 ppm

Ditimbang 50 mg zat aktif asam mefenamat dimasukkan kedalam labu ukur dan tambahkan 50 mL metanol, dikocok hingga homogen sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm (Supardi *et al.*, 2017)

b. Pembuatan Larutan Stok 250 ppm

Sebanyak 2,5 ml larutan asam mefenamat 1000 ppm di pipet kedalam labu ukur 10 ml dan tambahkan metanol sampai tanda batas. Larutan asam mefenamat 250 ppm ini akan dijadikan sebagai larutan stok (Supardi *et al.*, 2017)

c. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Dari larutan baku asam mefenamat 250 ppm diambil 0,36 mL lalu diencerkan dengan metanol sampai volume 10 mL hingga diperoleh konsentrasi 9 ppm. Larutan dengan konsentrasi 9 ppm tersebut dikocok hingga homogen dan dimasukkan kedalam kuvet

kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 200 – 400 nm (Supardi *et al.*, 2017).

d. Penetapan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengukur absorbansi konsentrasi 9 ppm dengan Spektrofotometri UV-Vis hingga hasil absorbansi yang diperoleh relative konstan, penentuan *operating time* dilakukan selama 30 menit (Supardi *et al.*, 2017).

e. Pembuatan Kurva Baku

Dari larutan baku 250 ppm dibuat seri konsentrasi 5, 7, 9, 11 dan 13 ppm dengan cara diambil 0,2; 0,28; 0,36; 0,44; dan 0,52 ml larutan stok kemudian diencerkan dengan metanol sampai 10 ml sehingga terbentuklah konsentrasi 5, 7, 9, 11, dan 13 ppm yang selanjutnya diukur pada Panjang gelombang maksimum 288 nm dengan pelarut metanol p.a sebagai blanko. Kurva standar dapat dibuat dengan membuat regresi linear antara konsentrasi dan absorbansi, sehingga diperoleh persamaan garis $y=ax+b$ (Supardi *et al.*, 2017).

1) Uji Linearitas

Pengujian linearitas menggunakan nilai koefisien (r) pada persamaan regresi linear kurva baku asam mefenamat dilakukan dengan menghitung secara statistik melalui koefisien korelasi dari konsentrasi dan absorbansi larutan baku. Linearitas dapat tercapai apabila nilai (r) semakin mendekati 1 ($r=+1$ atau $r=-1$) (Supardi *et al.*, 2017).

2) Uji Presisi

Dari larutan baku asam mefenamat 250 ppm dibuat larutan baku dengan konsentrasi 11 ppm dengan cara dipipet sebanyak 0,44 ml dan masukkan kedalam labu ukur 10 ml lalu tambahkan pelarut metanol hingga tanda batas. Larutan baku asam mefenamat dengan konsentrasi 11 ppm tersebut dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 288 nm. Uji presisi ini dilakukan dengan 6 kali pengulangan (Supardi *et al.*, 2017).

3) Uji Akurasi

Ditimbang 50 mg matriks jamu pegal linu yang tidak mengandung asam mefenamat sebanyak 3 kali penimbangan, masing-masing dimasukkan kedalam enlemeyer dan dilarutkan dengan 5 ml pelarut metanol kemudian ditambahkan larutan baku asam mefenamat masing-masing dengan konsentrasi 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm ketiga sampel tersebut, kocok hingga homogen kemudian masing-masing larutan dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml tambahkan pelarut metanol sampai dengan tanda batas dengan cara disaring menggunakan kertas saring. Larutan uji dimasukkan kedalam kuvet dan diukur serapannya pada panjang gelombang 288 dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Uji akurasi pada masing-masing larutan dilakukan 3 kali pengulangan. Hasil absorbansi yang didapatkan digunakan untuk

menghitung persen perolehan kembali (*%recovery*) (Supardi et al., 2017).

4) Batas Deteksi dan Batas Kuantitas

Penentuan *limit of detection*/ batas deteksi (LOD) dan *limit of quantitation*/ batas kuantitasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui persamaan garis linier dari kurva kalibrasi. Absorbansi larutan baku hasil pengukuran dimasukkan kedalam persamaan garis linier yang diperoleh (Supardi *et al.*, 2017).

LOD dan LOQ dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{SD}}{\text{slope}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{slope}}$$

Keterangan;

SD = Standar Deviasi (simpangan baku)

Slope = Arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva anatara respon terhadap konsentrasi.

Slope (b pada persamaan garis $y=ax+b$).

7. Analisis kuantitatif

- a. Penetapan kadar asam mefenamat menggunakan Spektrofotometri UV-Vis diawali dengan preparasi yaitu dengan cara ditimbang 50 mg secara seksama sampel yang diperkirakan mengandung asam mefenamat, kemudian letakkan dalam enlemeyer dan tambahkan metanol kemudian kocok hingga homogen, setelah itu dimasukkan

kedalam labu takar 50 mL dengan cara disaring dan tambahkan pelarut metanol sampai tanda batas. Dari larutan tersebut kemudian dipipet sebanyak 3 mL tambahkan dengan metanol sampai 10 mL, kemudian diukur menggunakan spektrofotometri UV- Vis pada panjang maksimum 288 nm. Analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum terhadap sampel jamu pegal linu yang positif mengandung asam mefenamat berdasarkan hasil analisis kualitatif, kemudian dihitung konsentrasinya berdasarkan persamaan garis linier yang didapatkan pada penentuan kurva kalibrasi standar asam mefenamat. Penetapan kadar dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali pada sampel jamu pegal linu yang positif mengandung asam mefenamat (Supardi *et al.*, 2017).

8. Analisis Data

a. Analisis Kualitatif

Analisis data dilakukan dengan beberapa tahapan. Pertama analisis data secara deskriptif yang meliputi uji organoleptis. Kedua, analisis deteksi KLT dilakukan dengan mengamati bercak yang dihasilkan di bawah sinar ultraviolet 254 nm. Kemudian bercak yang diperoleh dihitung nilai Rf (*Retardation factor*). Nilai Rf yang diperoleh dibandingkan dengan nilai Rf baku pembanding asam mefenamat (Rusmalina *et al.*, 2020).

b. Analisis Kuantitatif

Dari larutan standar diperoleh hasil panjang gelombang maksimal, persamaan kurva baku dan nilai R_f , persamaan kurva baku digunakan untuk menghitung kadar asam mefenamat di dalam sampel kemudian dianalisis menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum inilah didapatkan data absorbansi. Data absorbansi yang diperoleh kemudian dicari kadarnya menggunakan persamaan kurva baku dan dihitung persamaan $y = bx+a$ (Supardi *et al.*, 2017)