

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yaitu jamu pegal linu yang beredar di Kecamatan Ngawi, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur dan *online shop*.

2. Sampel

Metode sampling yang digunakan pada penelitian ini yaitu *purposive sampling*. *Purposive sampling* yaitu sampel diambil tidak secara acak, tetapi kriteria subjek ditentukan sendiri oleh peneliti (Ramadhan, 2021). Sampel jamu yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari 4 toko jamu berbeda di Ngawi dan *online shop* (A, B, C, dan D). Kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu, sampel merupakan jamu yang memiliki indikasi untuk membantu meredakan nyeri yang digunakan secara oral dengan bentuk sediaan serbuk, sampel merupakan jamu yang dipilih berasal dari merek berbeda satu sama lain, tidak memiliki maupun memiliki izin edar yang terdaftar maupun tidak terdaftar dari BPOM dengan jumlah sampel masing-masing 4 sampel tiap toko.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

1.1. Variabel utama pertama. Variasi sampel jamu pereda nyeri (pegal linu, nyeri haid, sakit kepala) dengan merek berbeda dari 4 toko jamu A, B, C, dan D yang beredar di Ngawi dan *online shop*.

1.2. Variabel utama kedua. Nilai R_f sampel dari analisis kualitatif dengan metode KLT, dan λ maksimum sampel dan baku pembandingan dari analisis dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

1.3. Variabel utama ketiga. Penggunaan fase gerak sikloheksan : kloroform : metanol : asam asetat glasial (60:30:5:5) dan fase diam silika GF₂₅₄ untuk analisis kualitatif dengan metode KLT.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi selanjutnya dapat diklasifikasi menjadi 3 variabel berdasarkan hubungan sebab-akibat, yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi sampel jamu pereda nyeri (pegal linu, nyeri haid, dan sakit kepala) dengan merek berbeda dari 4 toko jamu (A, B, C, dan D) di Kecamatan Ngawi, Kabupaten Ngawi, Provinsi Jawa Timur dan *online shop*.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu hasil nilai Rf pada analisis kualitatif menggunakan metode KLT dan spektra serapan asam mefenamat dalam jamu pereda nyeri dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

2.3. Variabel terkendali. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu kondisi percobaan, penggunaan sikloheksan : kloroform : metanol : asam asetat glasial (60:30:5:5) dan fase diam silika GF₂₅₄ pada analisis kualitatif dengan metode KLT, serta penggunaan pelarut etanol *pro analysis* dan baku standar asam mefenamat BPFI pada analisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, sampel jamu adalah sampel berupa jamu serbuk dengan khasiat membantu mengatasi nyeri dengan variasi merek dari 4 toko jamu berbeda (A, B, C, dan D) yang memenuhi kriteria inklusi sampel.

Kedua, metode KLT adalah metode analisis kualitatif dengan menggunakan fase gerak sikloheksan : kloroform : metanol : asam asetat glasial (60:30:5:5) dan fase diam silika GF₂₅₄, sehingga diperoleh parameter nilai Rf.

Ketiga, metode spektrofotometri UV-Vis adalah metode analisis kualitatif lanjutan dengan etanol sebagai blangko dan pelarut pada sampel jamu dan asam mefenamat BPFI sebagai baku standar, sehingga diperoleh spektra hasil serapan.

Keempat, validasi metode analisis adalah penilaian parameter tertentu untuk mengetahui metode spektrofotometri UV-Vis sesuai untuk membuktikan metode tersebut memenuhi syarat penggunaan dengan memperhatikan parameter linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD), dan batas kuantisasi (LOQ).

Kelima, analisis hasil adalah penilaian dari parameter nilai Rf pada analisis kualitatif, penetapan panjang gelombang maksimum asam mefenamat berdasarkan spektra hasil serapan.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah timbangan analitik (Ohaus PA413), oven (Mettler), plat tetes, chamber KLT 20x20 cm, kertas saring, mikropipet, *white tip*, lampu UV₂₅₄, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1601), kuvet kuarsa (Helma Analytic), flakon, pipet tetes, spatula, sendok tanduk, batang pengaduk, tisu, penggaris, pensil, labu tentukur (Iwaki), *beaker glass* (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), pipet volume (Iwaki), pipet ukur (Iwaki), pompa pipet (Glasfirn), kamera (Vivo Y83), kalkulator (CASIO fx-350EX).

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa merek jamu pereda nyeri yang dijual 2 toko jamu di Kecamatan Ngawi dan 2 toko jamu *online shop* (A, B, C, dan D), baku asam mefenamat BPFI (BPOM RI), FeCl₃ 1% (Merck), aquadest, plat silika GF₂₅₄ 20 x 20 cm (Merck), metanol p.a. (Merck), kloroform p.a. (Merck), etanol p.a. (Merck), asam asetat glasial p.a. (Merck), sikloheksana p.a. (Merck).

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel jamu pereda nyeri

Sampel jamu yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari 4 toko jamu berbeda di Ngawi dan *online shop* (A, B, C, dan D). Kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu, sampel merupakan jamu yang memiliki indikasi untuk membantu meredakan nyeri yang digunakan secara oral dengan bentuk sediaan serbuk, sampel merupakan jamu yang dipilih berasal dari merek berbeda satu sama lain, tidak memiliki maupun memiliki izin edar yang terdaftar maupun tidak terdaftar dari BPOM dengan jumlah sampel masing-masing 4 sampel tiap toko. Sampel sebanyak 16 produk berbeda yang beredar di Ngawi dan *online shop*, selanjutnya dilakukan pengecekan izin edar. Sampel dengan izin edar selanjutnya dilakukan analisis untuk mengetahui kandungan BKO asam mefenamat dalam sampel.

2. Analisis kualitatif sampel jamu dengan pereaksi warna FeCl₃

Sebanyak 175 mg sampel jamu ditimbang dan dimasukkan dalam 10,0 mL labu tentukur, kemudian ditambahkan etanol sampai tanda batas. Selama 10 menit didiamkan hingga bagian yang tidak larut terpisah dengan bagian yang terlarut. Bagian terlarut kemudian diambil

untuk digunakan sebagai sampel uji kualitatif (Hayun dan Karina, 2016).

Sampel jamu hasil preparasi direaksikan dengan 1 tetes larutan FeCl_3 1% pada plat tetes, kemudian diamati perubahan warna larutan yang dihasilkan. Larutan sampel akan membentuk warna merah sampai ungu apabila positif mengandung gugus senyawa aromatik yang bersifat asam (Rusmalina *et al.*, 2020).

3. Optimasi fase gerak KLT

Optimasi fase gerak dilakukan dengan menentukan fase gerak yang sesuai untuk mengeluasi sampel dan baku pembanding berdasarkan nilai R_f yang dihasilkan. Optimasi fase gerak dilakukan dengan mengeluasi baku pembanding menggunakan beberapa campuran pelarut. Fase gerak yang digunakan untuk optimasi fase gerak pada penelitian ini yaitu etil asetat: metanol: ammonia (80:10:10) (Rusmalina *et al.*, 2020). Fase gerak selanjutnya yaitu sikloheksana: kloroform : metanol : asam asetat glasial (60:30:5:5) dan kloroform metanol (9:1; 8:1 ; 7:3) (Rusnaeni, 2016). Fase gerak lain yaitu kloroform: etanol (8:1; 7:1) (Hayun dan Karina, 2016).

4. Analisis kualitatif dengan KLT-Spektrofotometri UV-Vis

4.1. Preparasi sampel jamu pereda nyeri. Satu dosis cuplikan, dimasukkan ke dalam erlenmyer, ditambahkan aquadest sebanyak 50 mL dan NaOH sampai pH basa (9-10), kemudian dilakukan pengocokan selama kurang lebih 30 menit, didiamkan sebentar dan selanjutnya disaring. Filtrat kemudian diasamkan dengan HCl 1 N sampai pH 3-4, selanjutnya diekstraksi dengan kloroform sebanyak 4 kali menggunakan 15 mL kloroform.

Hasil ekstraksi

kloroform kemudian diuapkan, sisa penguapan dilarutkan dengan 5 mL metanol p.a., sehingga diperoleh larutan A. Cara pembuatan larutan B sama dengan larutan A, namun dengan penambahan baku asam mefenamat sebanyak 15 mg dalam satu dosis cuplikan (Kemenkes RI, 2001).

4.2. Pembuatan larutan baku asam mefenamat untuk analisis kualitatif. Larutan baku asam mefenamat dibuat dengan menimbang 15 mg baku asam mefenamat kemudian dilarutkan dengan 10 mL metanol dalam labu tentukur (Kemenkes RI, 2001).

4.3. Identifikasi asam mefenamat dengan KLT. Lempeng KLT silika GF₂₅₄ dipotong dengan ukuran 8 cm x 4,5 cm sesuai

dengan jumlah sampel dan baku yang akan dianalisis dengan jarak antar sampel 1 cm (Hayun dan Karina, 2016). Lempeng KLT silika GF₂₅₄ diaktivasi sebelum digunakan dengan menggunakan oven suhu 105 °C selama 30 menit (Kemenkes RI, 1979). Larutan sampel dan baku pembanding ditotolkan pada lempeng KLT silika GF₂₅₄ menggunakan mikropipet dengan volume penotolan 60,0 µL. Lempeng dieluasi dalam chamber gelas yang telah dijenuhkan dengan menggunakan fase gerak (Kemenkes RI, 2001). Identifikasi diperoleh dengan pengamatan bercak dengan nilai R_f dan ukuran noda yang hampir sama (Kemenkes RI, 1979).

4.4. Analisis sampel jamu pereda nyeri dengan spektrofotometri UV-VIS. Noda sampel dan baku pembanding hasil KLT yang memiliki R_f mirip kemudian dikerok dan masing-masing noda hasil kerokan dilarutkan dalam 5 mL etanol. Larutan kemudian disaring dan filtrat hasil penyaringan diukur serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm. Asam mefenamat memberikan serapan pada panjang gelombang kisaran 288 nm (Kemenkes RI, 2001).

5. Validasi metode analisis spektrofotometri UV-Vis

5.1. Pembuatan larutan baku asam mefenamat untuk validasi metode analisis. Baku asam mefenamat ditimbang sebanyak 10,0 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur dan tambahkan 10,0 mL metanol, dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 1.000 ppm untuk analisis kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis (Sukmawati *et al.*, 2021).

5.2. Optimasi kondisi operasi dan *operating time*. Larutan baku 100 ppm diambil 3,0 mL lalu diencerkan dengan metanol sampai volume 10,0 mL dalam labu tentukur, sehingga diperoleh konsentrasi 30 ppm yang kemudian dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum pada rentang 200-400 nm dengan menggunakan blangko (Sukmawati *et al.*, 2021). *Operating time* selanjutnya ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum selama 15 menit sehingga diperoleh absorbansi yang konstan.

5.3. Pembuatan kurva baku asam mefenamat. Penetapan kurva baku dibuat dengan dibuat 5 seri konsentrasi larutan dari larutan baku asam mefenamat yaitu 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm, kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 286 nm dengan blangko (USP, 2013).

5.4. Linearitas. Parameter linearitas dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi dari baku asam mefenamat dan ditentukan persamaan garis linearnya. Data dari garis regresi itu sendiri mungkin berguna untuk memberikan estimasi matematis derajat linearitas. Koefisien korelasi, y-intersept, kemiringan garis regresi (*slope*) dapat diketahui dari persamaan garis linear (USP, 2013).

5.5. Batas deteksi (LOD). Batas deteksi (LOD) dihitung melalui persamaan regresi linear dari kurva baku, dengan rumus sebagai berikut (USP, 2013):

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \text{SD}}{S}$$

$$\text{SD} = \frac{\sqrt{\sum (y_i - y')^2}}{n-2}$$

Keterangan :

SD	: Standar Deviasi (simpangan baku)
S	: <i>Slope</i> (b pada persamaan garis $y = bx + a$)
y_i	: Absorbansi hasil analisis
n	: Jumlah pengulangan analisis
y'	: Absorbansi hasil perhitungan

5.6. Batas kuantifikasi (LOQ). Batas kuantifikasi (LOQ) dihitung melalui persamaan regresi linear dari kurva baku, dengan rumus (USP, 2013):

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

$$\text{SD} = \frac{\sqrt{\sum (y_i - y')^2}}{n-2}$$

Keterangan :

SD	: Standar Deviasi (simpangan baku)
S	: <i>Slope</i> (b pada persamaan garis $y = bx + a$)
y_i	: Absorbansi hasil analisis
n	: Jumlah pengulangan analisis
y'	: Absorbansi hasil perhitungan

5.7. Presisi. Larutan baku 20 ppm dibuat dari larutan induk asam mefenamat 100 ppm kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan 6 kali pengulangan, sehingga diperoleh parameter % RSD (*Relative Standard Deviation*) (USP, 2013).

5.8. Akurasi. Uji akurasi dilakukan dengan mengukur absorbansi dari larutan analit 10 ppm dengan 3 level konsentrasi berbeda (rendah, sedang, tinggi), yaitu 8 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm sebanyak 3 kali pengulangan (USP, 2013). Akurasi perlu dinilai sekurang-kurangnya tiga konsentrasi meliputi rentang yang ditetapkan, yaitu standar 80%, 100%, dan 120% (Warono dan Syamsudin, 2013). Analit uji dimasukkan dalam kuvet kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV. Parameter % *recovery* ditetapkan dari data hasil analisis yang diperoleh (USP, 2013).

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan secara deskriptif sesuai dengan fakta yang ada. Nilai R_f sampel pada analisa kualitatif dengan metode KLT dibandingkan baku pembanding untuk mengetahui keberadaan BKO asam mefenamat. Analisis lanjutan dengan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan pengukuran hasil spektra serapan sampel jamu dan baku pembanding asam mefenamat untuk menentukan keberadaan asam mefenamat.