

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain non-eksperimental yang bersifat deskriptif. Penelitian ini dilakukan pada sampel jamu pegal linu cair yang mengandung deksametason. Identifikasi deksametason dilakukan secara kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan secara kuantitatif menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilangsungkan di Laboratorium Biofarmakologi Progam Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Lokasi pengambilan sampel jamu pegal linu cair dilakukan di pasar yang berada di 5 Kabupaten di Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilangsungkan pada bulan Maret hingga bulan Mei 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Pada penelitian ini populasi yang digunakan yaitu jamu pegal linu cair yang diperjualbelikan di pasar besar Kabupaten Yogyakarta.

2. Sampel

Untuk penelitian ini, spesimen yang digunakan terdiri dari jamu pegal linu cair yang dikumpulkan dari beberapa pasar di Yogyakarta. Teknik pengambilan sampel *non probability* dengan cara *purposive sampling* untuk pemilihan sampel. Karakteristik utama dari sampel meliputi:

a. Kriteria inklusi : jamu berbentuk cair yang dijual di pasar Kabupaten Yogyakarta meliputi:

- 1) Kotamadya Yogyakarta : pasar Beringharjo
- 2) Bantul : pasar Bantul
- 3) Sleman : pasar Gamping

- 4) Kulonprogo : pasar Sentolo
- 5) Gunungkidul : pasar Karangmojo

Pada masing-masing pasar diambil 1 sampel jamu. Kriteria inklusi lain mencakup, jamu yang terindikasi sebagai jamu pegal linu tanpa label BPOM, tanpa nomor registrasi BPOM atau terdapat nomor registrasi BPOM akan tetapi tidak terdaftar di laman resmi BPOM serta berbagai merek yang berbeda dengan *range* harga Rp10.000 – Rp35.000.

- b. Kriteria eksklusi: jamu yang berbentuk serbuk atau kapsul, jamu yang dijual di luar pasar yang telah ditentukan, dan jamu yang telah melewati masa *expired date*.

D. Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang akan digunakan pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel Bebas

Beberapa merek sampel jamu pegal linu sediaan cair yang didapatkan dari pasar Beringharjo, pasar Bantul, pasar Gamping, pasar Sentolo, dan pasar Karangmojo merupakan variabel bebas dalam penelitian ini.

2. Variabel Terikat

Dalam penelitian ini variabel terikat berupa parameter analisis kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) diperoleh nilai R_f dan analisis kuantitatif yang dilakukan dengan mengukur kadar deksametason.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah berupa pelarut metanol, sediaan cair dan jamu pegal linu tanpa label BPOM tanpa nomor registrasi BPOM atau terdapat nomor registrasi BPOM akan tetapi tidak terdaftar di laman resmi BPOM.

E. Definisi Operasional

1. Sampel jamu yang digunakan diperoleh dari pasar Yogyakarta dengan merek berbeda.
2. Sampel yang diperoleh dilakukan proses ekstraksi dengan kloroform kemudian diuapkan di atas *waterbath* lalu dilarutkan dengan metanol *p.a*. Selanjutnya hasil ekstraksi digunakan untuk uji kualitatif menggunakan KLT.

3. Konsentrasi deksametason dalam sampel dapat dianalisis dengan menggunakan parameter nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum deksametason yang dinyatakan dalam % b/v.

F. Alat dan bahan Penelitian

1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat berupa spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10*), alat gelas (*Iwaki*), pipet ukur (*Iwaki*), mikropipet (*Ohaus*), neraca analitik (*Ohaus*), *chamber*, oven, sentrifugasi, timbangan semi mikro (*Ohaus*) serta *UV analyzer*.

2. Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan berupa sampel jamu cair pegal linu dari berbagai merek didapatkan di pasar Yogyakarta, baku pembanding deksametason (BPFI), metanol *pro analisis* (*Merck*), *aquadest*, kloroform, kertas saring, aseton (*Merck*), lempeng silika gel F₂₅₄, *white tip*, dan *blue tip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan Sampel

Berbagai merek jamu pegal linu cair yang berbeda telah diperoleh dari pasar Yogyakarta sesuai dengan kriteria sampel.

2. Analisis Organoleptis

Analisis organoleptis meliputi evaluasi warna, bentuk, dan bau dilakukan pada sampel.

3. Analisis Kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- a. Pembuatan larutan uji sampel

Pertama, disiapkan sampel jamu sebanyak 2 mL kemudian dimasukkan dalam gelas *beaker* lalu ditambahkan kloroform : metanol (9:1). Setelah itu diaduk dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate* selama 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit. Supernatan diambil dan diuapkan di atas penangas air dengan suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapatkan kemudian dilarutkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas labu ukur 10 mL.

b. Larutan baku pembanding

Pembuatan baku pembanding sama seperti pada jurnal (Rahmadani *et al.*, 2022) dengan modifikasi. Deksametason ditimbang sebanyak 10,0 mg menggunakan timbangan semi mikro kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan metanol *p.a* : *aquadest* dengan perbandingan 1:1 hingga tanda batas.

c. Identifikasi KLT

Selama 30 menit plat KLT diaktifkan pada oven dengan suhu 110°C. Setelah itu, plat tersebut ditandai dengan jarak 1 cm tepi bawah dan 1 cm tepi atas. Plat silika yang digunakan berukuran 10 x 8 cm. Di samping itu, dilakukan proses penjenuhan *chamber* menggunakan kertas saring dan fase gerak kloroform : aseton (4:1). Ditotolkan larutan sampel pada plat KLT yang telah diaktifkan dengan jarak penotolan 1 cm dan dimasukkan dalam *chamber* yang telah jenuh, kemudian diamati pergerakan fase gerak sampai mencapai garis atas. Selanjutnya plat dikeringkan dengan cara dianginkan dan diamati noda KLT pada sinar UV 254 dan 366 nm. Sampel jamu dikatakan positif deksametason jika terdapat bercak sampel yang sejajar dengan standar deksametason dengan nilai Rf 0,2 – 0,8.

Fase gerak : Kloroform : Aseton (4:1)

Fase diam : Silika Gel F₂₅₄

Penjenuhan : Kertas saring

Volume penotolan : ± 5µL

Penampakan bercak : Lampu UV 254 dan 366 nm, tampak bercak berwarna ungu. Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan nilai Rf (Rahmadani *et al.*, 2022).

4. Analisis Kuantitatif dengan Spektrofotometri UV-Vis

a. Pembuatan larutan uji sampel

Pertama, disiapkan sampel jamu sebanyak 2,0 mL kemudian dimasukkan dalam gelas *beaker* lalu ditambahkan kloroform : metanol (9:1). Setelah itu diaduk dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate* selama 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama

30 menit. Supernatan diambil kemudian ditambahkan metanol *p.a* hingga tanda batas labu takar 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 200.000 ppm.

b. Persiapan larutan standar

Pertama, dalam proses awal, sebanyak 100,0 mg dari standar deksametason ditempatkan ke dalam labu takar berukuran 100 mL. Ditambahkan ke dalamnya metanol *p.a* perlahan-lahan hingga deksametason larut sepenuhnya. Pada labu takar kemudian diisi kembali dengan metanol *p.a* sampai mencapai tanda sehingga akan diperoleh larutan deksametason dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, sebanyak 2,5 mL dari larutan 1000 ppm dipindahkan ke dalam labu takar berukuran 25 mL dan volumenya disesuaikan dengan metanol *p.a* untuk mencapai larutan yang konsentrasinya 100 ppm.

c. Penentuan panjang gelombang optimal

Diambil 1,0 mL larutan deksametason 100 ppm dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Metanol *p.a.* ditambahkan ke dalam labu takar hingga mencapai tanda sehingga akan menghasilkan larutan standar deksametason dengan konsentrasi 10 ppm. Larutan ini kemudian diukur serapannya dalam rentang panjang gelombang 200-400 nm untuk ditentukan panjang gelombang optimal deksametason.

d. Pembuatan kurva kalibrasi

Disiapkan larutan standar deksametason konsentrasi 8, 9, 10, 11, 12, dan 14 ppm dengan mengambil masing-masing 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; dan 1,5 mL pada larutan standar 100 ppm, kemudian diencerkan masing-masing hingga 10,0 mL dengan metanol *p.a.* Serapan larutan pada masing-masing konsentrasi diukur pada panjang gelombang optimal yang telah ditentukan.

e. Pengenceran Sampel

Setelah dilakukan preparasi untuk sampel, dilakukan pengenceran dengan mengambil 300 μ L dari larutan sampel 200.000 ppm lalu ditambahkan dengan 10 mL metanol dalam labu takar sehingga didapatkan konsentrasi 6.000 ppm.

f. Analisis larutan sampel jamu

Sampel yang dikatakan positif mengandung deksametason, selanjutnya di analisis kuantitatif dari sampel yang telah di preparasi dengan mengukur serapan larutan uji pada panjang gelombang maksimum dari larutan larutan baku deksametason (Ryansyah, 2022).

5. Validasi Metode Spektrofotometri

a. Presisi

Uji presisi dilakukan dengan pembacaan absorbansi larutan baku deksametason 10 ppm dengan pengulangan sebanyak 6x oleh analisis yang sama pada kondisi sama dan dalam rentang waktu yang pendek. Nilai presisi dinyatakan dalam simpangan baku relatif (RSD) (Minarsih & Roni, 2023).

b. Linearitas

Larutan baku deksametason konsentrasi 8, 9, 10, 11, 12, dan 14 ppm ditetapkan absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh. Selanjutnya dihitung persamaan kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y) sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = bx \pm a$ dengan nilai koefisien korelasi (r) mendekati 1 (Minarsih & Roni, 2023).

c. Batas deteksi (LOD) dan kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi dan kuantifikasi dapat dihitung menggunakan data standar deviasi (SD) dan *slope* (b) dari kurva kalibrasi yang diperoleh. Perhitungan menggunakan nilai k dimana nilai $k = 3,3$ untuk LOD dan $k = 10$ untuk LOQ (Minarsih & Roni, 2023).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Uji kualitatif dengan kromatografi lapis tipis (KLT)

Untuk menentukan uji kualitatif digunakan nilai R_f , jika nilai R_f sampel sejajar dengan standar deksametason, maka sampel dinyatakan positif (Enih, 2019).

$$R_f = \frac{\text{Jarak perambatan komponen sampel}}{\text{Jarak perambatan fase gerak}}$$

2. Uji kuantitatif dengan Spektrofotometri UV-Vis

Dalam analisis sampel jamu pegal linu, perhitungan kadar deksametason digunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan membuat persamaan regresi. Hubungan antara konsentrasi (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y) merupakan regresi linier. Rumus yang digunakan dalam pembuatan persamaan regresi linier adalah:

$$Y = bx + a$$

Keterangan:

Y = absorbansi

a = nilai a pada persamaan

x = kadar analit

b = *slope*/nilai b pada persamaan (Lestari *et al.*, 2017)

3. Perhitungan Kadar Deksametason

Data yang diperoleh diperiksa dengan mengaitkan antara konsentrasi larutan sampel (x) dan nilai absorbansi sampel (y) kemudian akan dilanjutkan dengan menghitung regresi linier dengan persamaan:

$$y = bx + a$$

Kemudian kadar dapat dihitung nilai penetapan kadar dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar} = \frac{C \times V \times F}{V_s}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi

V = Volume larutan sampel

F = Faktor Pengenceran

V_s = Volume penimbangan sampel (Lovianasari *et al.*, 2021)

4. Perhitungan Nilai rata-rata (\bar{X})

Rata-rata (\bar{X}) diperoleh dengan menjumlahkan semua nilai data dan membaginya dengan jumlah total data yang tersedia. Rumus untuk menghitung mean dinyatakan sebagai berikut.

$$\bar{X} = (\sum x) / N$$

Keterangan :

\bar{X} = nilai rata-rata sebelum

x = nilai data dari $X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$

N = jumlah kejadian atau jumlah frekuensi (Bardja, 2017).

5. Standar Deviasi (SD)

Standar deviasi merupakan akar pangkat dua dari variansi (Hesni, 2020).

6. *Coefficient Variation* (CV)

Koefisien variasi (CV) mewakili rasio deviasi standar terhadap nilai rata-rata yang dihitung dalam suatu distribusi, yang memberikan ukuran variabilitas relatif di antara data. Untuk menghitung nilai koefisien variasi digunakan rumus berikut ini.

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}}$$

Keterangan :

CV = *Coefficient variation* (koefisien variasi)

SD = Standar deviasi

\bar{X} = nilai hitung rata-rata (Yusniyanti Ena, 2017).

7. Interval Kepercayaan (*Limit of error*)

Interval kepercayaan digunakan untuk menentukan seberapa akurat rerata atau proporsi sampel dalam mewakili populasi sebenarnya (Hartland, 2020). Perhitungan dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$LE = t \times \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

Keterangan :

LE = *limit of error*

t = nilai t tabel

SD = standar deviasi

N = banyak sampel