

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Alat

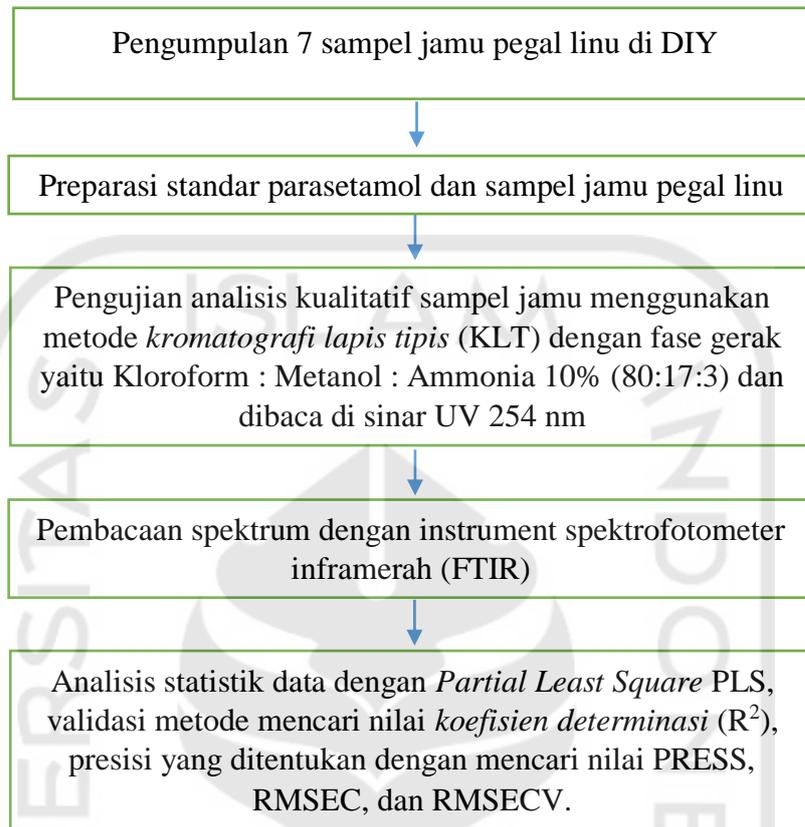
Alat yang digunakan antara lain: kaca arloji; batang pengaduk; spatula; pipet tetes; flakon; mortir; stamper; timbangan analitik kepekaan 0,01 mg (Mettler Toledo, XS 205 DU); gelas beaker 100 ml (Pyrex); gelas ukur 10 ml (Pyrex); oven (Mettler) bejana kromatografi (Camag); ultrasonikator (Branson), sentrifugator (Hanil); linomat 5 (Camag), TLC Scanner (Camag); spektrofotometer FTIR-ATR PerkinElmer Spectrum Two dengan detektor DTGS (*Deuterated Triglycine Sulphate*) yang dihubungkan dengan *software* Spectrum™ 10 digunakan untuk mengukur spektra FTIR dan *Software* Minitab 18 untuk menganalisis spektra FTIR dengan teknik kalibrasi multivariat.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan antara lain: sampel jamu pegal linu yang diperoleh dari toko-toko jamu di Yogyakarta dengan kriteria yang sesuai inklusi antara lain : klaim khasiat jamu pegal linu tertera pada bungkus kemasan, jamu yang tidak terdapat nomor registrasi BPOM, serta jamu yang tidak terdaftar di BPOM tetapi mencantumkan nomor registrasi fiktif pada kemasan; standar parasetamol (BPL BPOM); KBr p.a (Merck); Plat KLT silika gel GF254 (Merck); metanol p.a (J.T.Baker); kloroform p.a (J.T.Baker); etil asetat p.a (J.T.Baker); ammonia (Merck) dan akuades yang diperoleh dari laboratorium kimia farmasi Universitas Islam Indonesia.

3.2 Tahapan Penelitian

3.2.1 Skema Penelitian



3.3. Uraian Penelitian

3.3.1 Pengumpulan Sampel Jamu

Dipilih sampel jamu pegal linu kemasan yang diperoleh dari toko-toko jamu yang berada di daerah Yogyakarta. Pemilihan jamu berdasarkan kriteria yaitu jamu yang tidak mengandung bahan kimia obat BKO berupa parasetamol, jamu terdapat nomor registrasi yang tercantum dalam BPOM, dan khasiat yang tertera pada kemasannya.

3.3.2 Pengujian Kualitatif Sampel Jamu

3.3.2.1 Preparasi Standar Parasetamol

Serbuk standar Parasetamol sebanyak 10 mg ditimbang secara seksama kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan pelarut metanol p.a hingga tanda batas kemudian dihomogenkan.

3.3.2.2 Preparasi Sampel Jamu Pegal Linu.

Sebanyak 100 mg sampel jamu pegal linu yang diduga terdapat parasetamol diekstraksi menggunakan metanol 10 mL, kemudian disonifikasi selama 30 menit dan kemudian diendapkan serbuknya menggunakan sentrifuge sebesar 3000 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatant diambil dan dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL.

3.3.2.3 Pembacaan Nilai Rf menggunakan KLT – Densitometer

Supernatant sampel jamu dan standar parasetamol ditotolkan pada fase diam berupa silica Gel GF 254 dengan menggunakan linomat sebanyak 3 μ L dan dielusi menggunakan fase gerak berupa kloroform : metanol : ammonia 10% (80:17:3%) dan dibaca menggunakan KLT Desitometer (Tourisma T, 2011).

3.3.3 Pengujian Kuantitatif Parasetamol

3.3.3.1 Penyiapan Standar Parasetamol

Standar parasetamol yang diperoleh dari BPOM digerus dengan KBr yang telah diaktivasi dengan cara dimasukkan kedalam oven pada temperatur 100°C selama 1 jam dengan perbandingan 50: 950 (50 mg ekstrak: 950 mg KBr). Standar kemudian disimpan dalam botol kedap udara.

3.3.3.2 Preparasi Sampel Jamu Pegal Linu

Ditimbang serbuk jamu sampel sebanyak 100 mg, kemudian dimasukkan ke mortir, setelah itu dicampur dengan standar parasetamol dalam KBr dengan bervariasi kadar 1%; 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 40%; 45%; 80; dan 85%. Pada penimbangan konsentrasi 1% dan 5% diperlukan campuran Parasetamol dengan KBr, hal ini disebabkan karena kapasitas dari timbangan analitik memiliki batas rendahnya adalah 10 mg. Campuran Parasetamol dengan KBr dibuat dengan volume berat total 1000 mg, dengan komposisi 950 mg KBr dan 50 mg Parasetamol.

Tabel 3.1 Konsentrasi dan komposisi sampel analisis

Jamu	Konsentrasi Spike Parasetamol	Bobot Campuran Parasetamol + KBr (mg)	Bobot Parasetamol (mg)	Bobot Jamu (mg)
Sidomuncul	1%	20	-	99
Jamu Leo	5%	100	-	95
Linuric	10%	-	10	90
Sidomuncul	15%	-	15	85
Jamu Leo	20%	-	20	80
Linuric	25%	-	25	75
Sidomuncul	40%	-	40	60
Jamu Leo	45%	-	45	55
Linuric	80%	-	80	20
Sidomuncul	85%	-	85	15

3.3.3.3 Pembacaan Spektrum FTIR.

Serbuk jamu yang mengandung standar parasetamol ditempatkan pada kristal ATR (*Attenuated Total Reflectance*) pada temperatur terkendali. Pengukuran dilakukan pada 32 *scanning*, dan pada daya pisah (resolusi) 1 cm^{-1} . Setelah dilakukan *scanning*, lempeng kristal ATR dibersihkan dengan aseton 2 kali dan metanol 2 kali serta dikeringkan dengan kertas tissue halus. Untuk menghindari adanya variasi spektra antar waktu, maka spektrum dasar (*background*) diukur setiap kali akan dilakukan pengukuran sampel. Semua spektra direkam pada 4000 sampai 645 cm^{-1} dan dilakukan replikasi 3 kali, serta direkam dalam bentuk absorbansi.

3.4 Analisis Data

3.4.1 Analisis Kualitatif Dengan KLT- Densitometri

Dalam penelitian ini digunakan analisis kualitatif untuk membuktikan bahwa 7 sampel jamu pegal linu yang akan diujikan tidak mengandung parasetamol. 7 sampel tersebut akan dibandingkan dengan standar parasetamol berdasarkan nilai R_f yang dihasilkan. Jika nilai R_f dari 7 sampel jamu pegal linu yang diujikan salah satunya memiliki nilai R_f yang sama dengan standar parasetamol, maka sampel

tersebut diduga mengandung parasetamol sehingga sampel akan dieksklusi atau tidak digunakan untuk pembacaan di Spektrofotometri FTIR.

3.4.2 Analisis pada spektrofotometri FTIR

Analisis hasil FTIR berdasarkan besar bilangan gelombang yang merupakan ciri khas dari suatu gugus fungsi sampel tersebut dengan beberapa parameter. Hasil pembacaan 3600 bilangan gelombang ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) akan diolah dengan metode *PLS* oleh software Minitab 18 dan didapatkan sejumlah bilangan gelombang yang mempresentasikan parasetamol berdasarkan dari nilai koefisien determinasi (R^2) yang paling baik. Untuk mengetahui kandungan parasetamol yang di *spike* ke dalam jamu pegal linu maka ditentukan dengan melihat perbandingan antara kadar parasetamol yang ditambahkan dalam sampel *spike* terhadap kadar parasetamol yang diprediksi oleh spektrofotometer FTIR. Perbandingan tersebut akan dilihat melalui metode *PLS* dengan parameter presisi dalam pemodelan kalibrasi yaitu RMSEC (*Root Mean Square Error Of Calibration*) ditunjukkan pada hasil yang mendekati nilai 0 maka hasilnya semakin baik. Agar metode ini dapat digunakan selain pada sampel jamu pegal linu yang peneliti gunakan, maka metode ini sebelumnya perlu dilakukan validasi sehingga dapat digunakan untuk semua sampel jamu pegal linu yang memiliki kandungan serupa. Parameter validasi yang digunakan untuk metode ini yaitu RMSECV (*Root Mean Squares Error Of Cross Validation*) dan PRESS (*Predictive Residual Error Sum Of Squares*). Nilai parameternya masing - masing yaitu mendekati nilai 0 maka hasilnya semakin baik.

Analisis hasil FTIR menggunakan metode kalibrasi multivariat *Partial Least Square* (PLS) berdasarkan beberapa parameter validasi yaitu nilai koefisien determinasi (R^2), presisi dievaluasi berdasarkan nilai RMSEC, PRESS, dan RMSECV. Dimana besar bilangan gelombang dari parasetamol menjadikan ciri khas dari suatu gugus fungsi sampel tersebut. Ketidakpastian kalibrasi dan prediksi kadar yang tidak diketahui dihitung dengan *root mean standard error of calibration* (RMSEC) dan *root mean square error of cross validation* (RMSECV) dengan persamaan dibawah ini :

$$RMSEC = \sqrt{\sum \frac{(x - y)^2}{n - 1}}$$

Rumus 3.1. *Root mean standard error of calibration RMSEC*

Dimana x adalah nilai sebenarnya (*actual*), y adalah nilai terhitung (*calculated*), dan n adalah banyak nya data konsentrasi yang di randomisasi, (Danzer *et al.*, 2004).

$$RMSECV = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_i^{(calc)} - \hat{y}_i^{(true,cs)})^2}{n}}$$

Rumus 3.2. *Root mean square error of cross validation RMSECV*

Dimana $y_i^{(true,cs)}$ adalah kadar aktual sampel validasi dan $y_i^{(calc)}$ adalah kadar prediksi sampel, (Danzer *et al.*, 2004). Parameter lain untuk mengukur presisi kalibrasi multivariat adalah *predictive residual error sum of squares* (PRESS) yang dihitung dengan persamaan berikut :

$$PRESS = S_{res}^2 + \sum_{i=1}^n e_i^2 = (y_i^{(calc)} - \hat{y}_i^{(true,cs)})^2$$

Rumus 3.3. *Predictive residual error sum of squares PRESS*

