

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian adalah secara eksperimental.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Februari 2025. Dilakukan di Laboratorium Analisis Obat dan Narkotika Jurusan D-3 Analisis Farmasi dan Makanan Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain natrium nitrit (Merck), asam sulfat pekat, reagen Metil Merah, besi (III) klorida heksahidrat (Emsure), reagen Folin Ciocalteu (Merck), etanol 96%, akuades, kertas whatman 1 chromatography, standar parasetamol, dan sampel jamu pegal linu.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain neraca analitik (Radwag), spatula, labu ukur 25 ml (Iwaki), labu ukur 50 ml (Iwaki), pipet ukur 5 ml (Iwaki), bola hisap, pipet tetes, gelas piala 50ml (Iwaki), loyang, pinset, lemari asam, dan plat tetes.

3.4 Variabel Penelitian

Terdapat dua variabel dalam penelitian ini, yakni variabel bebas dan terikat. Variabel bebas adalah variabel yang berpengaruh pada variabel lain, dan pada penelitian ini reagen yang digunakan merupakan variabel bebas. Sedangkan variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh sejumlah variabel lain. Dalam penelitian ini variabel terikat yakni parasetamol.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Berikut merupakan definisi operasional variabel, yang terdiri dari variabel penelitian, definisi operasional, parameter, alat ukur, dan skala ukur yang digunakan:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel Penelitian	Definisi operasional	Parameter	Alat ukur	Skala ukur
1.	Reagen	Bahan kimia yang menghasilkan reaksi warna spesifik saat bereaksi dengan parasetamol.	Jenis reagen yang digunakan (Folin Ciocalteu, Metil Merah, FeCl_3 dan Lieberman 1M)	-	Nominal
2.	Parasetamol	Identifikasi parasetamol dalam sampel jamu menggunakan strip tes berdasarkan perubahan warna akibat reaksi kimia.	Perubahan warna pada strip	Perubahan warna pada strip	Nominal

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi reagen

Dalam penelitian ini beberapa reagen yang digunakan dipersiapkan secara mandiri maupun diperoleh secara komersial, reagen Metil Merah dan reagen Folin-Ciocalteu diperoleh secara langsung dari penyedia bahan kimia. Reagen FeCl_3 dan reagen Folin-Ciocalteu disiapkan melalui proses pembuatan di laboratorium.

3.6.1.1 Reagen FeCl_3 10%

Sejumlah lebih kurang 10 g besi (III) klorida heksahidrat ditimbang dengan seksama. Setelah itu, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian dilarutkan dengan akuades, ditambahkan hingga mencapai tanda batas, dan dihomogenkan (Sentat et al., 2020)

3.6.1.2 Reagen Lieberman 1M

Sejumlah lebih kurang 0,5 ml asam sulfat pekat dipipet dan diambil untuk digunakan dalam pembuatan asam sulfat 1M. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan akuades hingga mencapai tanda batas. Sebanyak lebih kurang 1 g natrium nitrit ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol gelap. Kemudian, asam sulfat 1M yang telah dibuat dimasukkan ke dalam botol gelap yang berisi natrium nitrit (Williams, 1981).

3.6.2 Imobilisasi reagen pada kertas

Imobilisasi dilakukan dengan metode *entrapment*, yaitu dengan memotong kertas Whatman 1 *Chromatography* menjadi ukuran 2x3 cm. Kertas tersebut direndam dalam masing-masing reagen sebanyak 5 ml selama 60 menit, kertas diangkat kemudian diangin-anginkan selama 30 menit.

3.6.3 Preparasi Pembanding Parasetamol 500 ppm

Sejumlah lebih kurang 12,5 mg standar parasetamol ditimbang seksama kemudian dilarutkan dalam etanol 96% didalam labu ukur 25 ml.

3.6.4 Preparasi Larutan Sampel Jamu Pegal Linu 500 ppm

Sejumlah lebih kurang 12,5 mg sampel jamu ditimbang seksama kemudian dilarutkan dalam etanol 96% didalam labu ukur 25 ml.

3.6.5 Preparasi Larutan *Spiked*

Sejumlah lebih kurang 12,5 mg standar parasetamol dan 12,5 mg sampel jamu pegal linu ditimbang seksama kemudian dilarutkan dalam etanol 96% didalam labu ukur 25 ml.

3.6.6 Uji Waktu Respon

Sebanyak 2 tetes larutan pembanding parasetamol diteteskan pada strip tes, dan dilakukan pengambilan gambar dalam kondisi pencahayaan seragam untuk meminimalkan variasi akibat lingkungan. Pengambilan gambar dilakukan pada menit ke-5,15,30,45, dan 60. Gambar yang dihasilkan selanjutnya dilakukan pengolahan data menggunakan aplikasi *color picker* untuk

mengetahui waktu optimum yang dibutuhkan. Penjelasan lebih lanjut mengenai aplikasi *color picker* dapat dilihat pada bagian 3.7. Waktu optimum dinyatakan ketika nilai intensitas stabil.

3.6.7 Uji Validasi

Prosedur uji validasi merupakan tahap krusial dalam memastikan keandalan suatu metode analisis sebelum digunakan secara luas. Dalam penelitian ini, validasi metode dilakukan dengan menguji parameter spesifisitas dan *Limit of Detection* (LoD). Spesifisitas bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan metode dalam mengidentifikasi dan membedakan analit dari komponen lain dalam sampel, sehingga dapat memastikan bahwa hasil yang diperoleh tidak dipengaruhi oleh gangguan matriks. Sementara itu, LoD digunakan untuk menentukan konsentrasi minimum analit yang masih dapat dideteksi oleh metode, meskipun tidak harus dapat dikuantifikasi secara presisi.

3.6.7.1 Uji Spesifisitas

Sebanyak 0,05 ml masing-masing larutan pembanding parasetamol, sampel jamu, dan *spiked* ditetaskan pada strip tes. Perubahan warna yang terjadi diamati pada waktu uji respon yang optimal. Dilakukan pengolahan data menggunakan *color picker* untuk melihat perubahan warna lebih jelas.

3.6.7.2 Uji *Limit of Detection* (LoD)

Dari larutan pembanding parasetamol 500 ppm, dilakukan pengenceran dengan seri konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Sebanyak 0,05 ml masing-masing seri konsentrasi ditetaskan pada strip tes, dan perubahan warna yang terjadi diamati pada waktu uji respon yang optimal. Serta dilakukan pengolahan data menggunakan *color picker* untuk mendapatkan nilai absorbansi dari intensitas warna yang dihasilkan.

3.7 Pengolahan Dan Penyajian Data

Pengolahan data dilakukan dengan memanfaatkan hasil perubahan warna yang dihasilkan oleh strip tes setelah bereaksi dengan sampel. Foto diambil dalam kondisi pencahayaan seragam untuk meminimalkan variasi akibat lingkungan. Dan dilakukan pengolahan data menggunakan aplikasi *color picker* untuk mendapatkan nilai intensitas warna dan melihat warna yang dihasilkan lebih jelas. Cara penggunaan aplikasi *color picker* dapat dilakukan dengan cara hasil gambar dimasukkan kedalam aplikasi *color picker* sehingga didapatkan nilai intensitas warna yakni nilai *red*, *green*, dan *blue*. Hasil nilai intensitas warna yang didapatkan nantinya dapat digunakan untuk melihat waktu yang optimum pada strip tes, dan untuk mendapatkan nilai absorbansi pada uji limit deteksi. Hasil pengukuran disajikan dalam bentuk tabel, terdapat 3 tabel yakni tabel uji waktu respon, uji spesifisitas dan uji limit deteksi.

Tabel uji waktu respon adalah waktu yang dibutuhkan reagen untuk bereaksi dengan analit dan menghasilkan perubahan warna. Waktu respon yang optimal menunjukkan metode deteksi yang efisien dan mampu memberikan hasil dengan cepat dan akurat. Pada tabel uji waktu respon mencakup nama reagen serta hasil dari pengujian

Tabel 3.2 Tabel Uji Waktu Respon Strip Tes pada pembanding parasetamol

No	Reagen yang digunakan	Strip tes setelah direaksikan (5,15,30,45, 60 menit)
1.	Folin Ciocalteu	
2.	Metil Merah	
3.	FeCl ₃	
4.	Lieberman 1M	

Tabel uji spesifisitas dilakukan untuk memastikan bahwa strip tes hanya memberikan respons terhadap parasetamol dan tidak bereaksi dengan senyawa lain yang mungkin terdapat dalam sampel jamu. pada tabel uji spesifisitas mencakup reagen yang digunakan, gambar strip tes sebelum dan sesudah direaksikan.

Tabel 3.3 Uji Spesifisitas pada Strip Tes menggunakan pembanding parasetamol, jamu, dan *spiked*

No	Reagen yang digunakan	Strip tes sebelum direaksikan	Strip tes setelah direaksikan
1.	Folin Ciocalteu		
2.	Metil Merah		
3.	FeCl ₃		
4.	Lieberman 1M		

Tabel uji Limit deteksi atau *Limit Of Detection* (LoD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi oleh metode analisis untuk menentukan konsentrasi terkecil suatu zat yang masih dapat terdeteksi oleh metode analisis yang digunakan. Rumus untuk mendapatkan nilai LoD sebagai berikut:

$$\text{LoD} = 3,3 \times \frac{SD}{\text{slope}}$$

dimana nilai SD didapatkan dari rumus:

$$SD = \frac{\text{jumlah keseluruhan } (Y-Y')^2}{\text{konsentrasi yang digunakan}} \times 0,5$$

Nilai Y' (Y aksen) adalah nilai sinyal, nilai Y-Y' adalah selisih antara nilai sinyal terukur (absorpsi) dengan nilai sinyal. Sedangkan Y-Y'² adalah kuadrat selisih yang nantinya akan digunakan untuk menghitung standar deviasi. Tabel Y', Y-Y' dan (Y-Y')² terdapat pada bagian lampiran 4. Sedangkan nilai slope adalah nilai b yang didapatkan dari persamaan regresi, SD adalah nilai standar deviasi dan LoD adalah nilai batas deteksi dan dapat dilihat pada tabel 3.4

Tabel 3.4 Uji LoD pada Strip Tes pembanding parasetamol

No	Reagen yang digunakan	Slope	SD	LoD