BAB III
METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen komparatif, yaitu penelitian yang digunakan untuk mengetahui dan membandingkan pengaruh variabel independen (bebas) terhadap variabel dependen (terikat) dalam kondisi yang terkendalikan. Dalam penelitian ini yaitu untuk mengetahui dan membandingkan jenis fase gerak yang dapat digunakan untuk mendeteksi bahan kimia obat deksametason di dalam sampel jamu pegal linu yang dapat menghasilkan pemisahan yang paling baik.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari - Maret 2025 di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Shimadzu i- Series LC-2050C, detektor UV, kolom C18 (150 mm x 4,6 mm), seperangkat alat komputer DELL, vial HPLC, sentrifugasi, sonikator, neraca analitik, beaker glass Iwaki , labu ukur 25 mL dan 10 mL Iwaki , pipet volume 10 mL Iwaki, bulb, mikropipet 100 – 1000 µL, tabung reaksi Iwaki, rak tabung, spluit dan penyaring membran ukuran 0,22 µm.

3.3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah baku pembanding deksametason BPFI, kertas timbang, sampel jamu pegal linu BPOM, *metanol Merck grade HPLC*, dan *Water For Injection.*

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode KCKT perbandingan variasi fase gerak.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah optimasi fase gerak dengan parameter waktu retensi*, tailing factor*, nilai resolusi, lempeng teoritis dan

validasi metode dengan parameter akurasi, presisi, linieritas, spesifisitas, LOD serta LOQ.

3.5. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Metode KCKT perbandingan variasi fase gerak	Metode analisis KCKT dengan variasi fase gerak methanol: air	Instrumen KCKT *Shimadzu i-Series LC-2050C*	Instrumen KCKT *Shimadzu i-Series LC-2050C*	Perbandingan fase gerak yang paling optimal	nominal
Validasi Metode: Akurasi Presisi Linieritas Spesifisitas LOD dan LOQ	Paremeter – parameter yang digunakan dalam validasi metode KCKT.	*Aplikasi Lab Solution KCKT dan Microsoft excel.*	*Aplikasi Lab Solution KCKT dan Microsoft Excel.*	Akurasi : 90-107% Presisi : < 2% *Linieritas : mendekati 1* Spesifisitas : Tidak ada puncak yang sama dengan baku pada kromatogram pelarut LOD: - LOQ: -	nominal
Optimasi Fase Gerak: Waktu Retensi, *tailing factor*, nilai resolusi dan lempeng teoritis.	Parameter-parameter yang digunakan dalam optimasi fase gerak metode KCKT.	*Aplikasi Lab Solution KCKT* dan uji statistik ANOVA.	*Aplikasi Lab Solution KCKT* dan uji statistik ANOVA.	Waktu retensi: menit *Tailing factor:* (TF ≤ 2) Nilai resolusi: (Rs > 1,5) Lempeng Teoritis: (N > 2000)	nominal

3.6. Prosedur

3.6.1. Preparasi Baku Pembanding Deksametason BPFI

Sejumlah lebih kurang 12,5 mg Deksametason BPFI dimasukkan ke dalam labu 25 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol. Pipet 15 mL larutan baku pembanding deksametason BPFI, selanjutnya dimasukkan dalam ke dalam labu 25 mL dan ditandabataskan menggunakan metanol. Disaring menggunakan penyaring membran 0,22 mikrometer dan dimasukkan ke dalam vial KCKT (Kemenkes RI, 2020).

3.6.2. Preparasi Sampel *Spiked*

Sejumlah lebih kurang 1 g sampel jamu pegal linu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Ditambahkan metanol sebanyak 8 mL, dilakukan sonikasi selama 15 menit. Disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm, selanjutnya filtrat disaring dengan penyaring membran berukuran 0,22 mikrometer, ditambahkan 1 ml larutan baku pembanding deksametason BPFI, ditandabataskan dalam labu takar 10 mL dan dimasukkan ke dalam vial KCKT (Fajri, 2020)

3.6.3. Sistem Kromatografi

Instrumen KCKT yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Shimadzu i-Series LC-2050C dengan perangkat lunak *LabSolution*, kolom C18. Detektor UV, panjang gelombang deteksi 239 nm. Fase gerak metanol:air (55:45, 60:40,65:35 dan 70:30) dengan sistem elusi secara isokratik. Volume injeksi 20 µL dan laju alir 1 ml/ menit (Riswanto et al., 2017)

3.6.4. Optimasi Fase Gerak

Sebanyak 20 µL larutan *spiked* dan baku pembanding deksametason BPFI dengan konsentrasi 30ppm diinjeksikan ke dalam injektor KCKT dengan sistem kromatografi kolom C_{18}, detektor UV, panjang gelombang deteksi 239 nm. Fase gerak metanol:air (55:45, 60:40,65:35 dan 70:30) dengan sistem elusi secara isokratik. Volume injeksi 20 µL dan laju alir 1 ml/ menit. Kemudian diamati nilai waktu retensi, nilai resolusi, tailing faktor dan jumlah lempeng teoritis.

3.6.5. Uji Kesesuaian Sistem

Larutan baku BPFI Deksametason diinjeksikan sebanyak 6 kali berturut-turut ke dalam sistem kromatografi yang paling optimal (Yusransyah et al., 2014).

3.6.6. Validasi Metode Analisis

3.6.5.1 Linieritas

Larutan baku BPFI Deksametason dengan seri konsentrasi 3, 6, 9, 15, 18, 21 dan 24 µg/mL Sebanyak 20 µL larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada sistem kromatografi yang paling optimal. Nilai Linieritas dihitung dengan membuat kurva kalibrasi dengan persamaan garis linear (y= a + bx). Dihitung koefisien korelasi (r) dari kurva tersebut (Sugihartini et al., 2014).

3.6.5.2 LOD dan LOQ

Larutan baku BPFI Deksametason dengan seri konsentrasi 3, 6, 9, 15, 18, 21, 24 µg/mL Sebanyak 20 µL larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada sistem kromatografi yang paling optimal. Nilai LOD dihitung dengan rumus LOD = 3,3(SD/S) dan LOQ = 10(SD/S) dimana SD adalah standar deviasi dari respon berdasarkan standar deviasi residual dari kurva kalibrasi dan S adalah slope dari kurva kalibrasi (Sugihartini et al., 2014).

3.6.5.3 Akurasi dan Presisi

Larutan sampel dan larutan *spiked* 20 µg/mL disuntikkan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan sistem kromatografi yang paling optimal. Dilakukan replikasi sebanyak enam kali. Nilai akurasi diperoleh dari nilai perolehan kembali (% recovery) dan presisi dengan menghitung persentase simpangan baku relative % RSD (Susilawan et al., 2019)

3.6.5.4 Spesifisitas

Larutan BPFI Deksametason, larutan *spiked* sampel, dan pelarut disuntikkan secara terpisah sebanyak 20 µL ke dalam KCKT dengan sistem kromatografi yang paling optimal. Pada daerah waktu retensi baku deksametason tidak boleh ada gangguan. Metode dikatakan memiliki spesifisitas yang baik apabila tidak ada puncak yang memiliki waktu retensi yang sama dengan waktu retensi dari senyawa baku (Pramudita, 2015).

3.7. Pengolahan dan Penyajian Data

Data yang diperoleh berupa data kuantitatif dari hasil optimasi fase gerak KCKT dan kandungan deksametason pada jamu pegal linu dengan metode KCKT, kemudian dilakukan uji statistika ANOVA pada hasil yang didapatkan serta dilanjutkan dengan uji validasi. Penyajian data menggunakan tabel.

Tabel 3. 2 Data Optimasi Fase Gerak Metanol:Air

Perbandingan Fase Gerak Metanol:Air	**Parameter Optimasi Gerak Fase Gerak**				
	Waktu retensi		***Tailing Factor***	**Nilai Resolusi**	**Lempeng Teoritis**
BPFI Deksametason					
Metode I (55:45)					
Metode II (60:40)					
Metode III (65:35)					
Metode IV (70:30)					
Sampel *Spiked*					
Metode I (55:45)	1				
	2				
	3				
Metode II (60:40)	1				
	2				
	3				
Metode III (65:35)	1				
	2				
	3				
Metode IV (70:30)	1				
	2				
	3				
Persyaratan					
		menit	**TF ≤ 2**	**Rs > 1,5**	**N > 2000**

Metode yang paling optimal akan dilanjutkan ke uji validasi yang meliputi spesifisitas, linieritas, LOD, LOQ, akurasi, dan presisi.

Tabel 3. 3 Hasil data parameter- parameter uji validasi metode KCKT yang paling Optimal

Perbandingan Fase Gerak	**Parameter – Paramter Validasi Metode**					
	Spesifisitas	**Linieritas**	**LOD**	**LOQ**	**Akurasi**	**Presisi**
Metode						
Persyaratan	**Tidak ada gangguan pada daerah waktu retensi analit yang dianalisis**	**r > 0,990**	**-**	**-**	**80-115%**	**3-12%**

3.8. Analisis Data

Analisis data optimasi fase gerak dengan membandingkan hasil pemisahan yang optimal antara sampel *spiked* dan baku pembanding BPFI berdasarkan parameter waktu retensi, nilai resolusi, lempeng teoritis dan *tailing faktor*. Metode yang memenuhi persyaratan parameter optimasi dilanjutkan ke dalam uji validasi berupa selektifitas, linieritas, LOD, LOQ, akurasi dan presisi pada metode yang telah optimal. Hasil validasi metode dibandingkan dengan persyaratan validasi sesuai dengan literatur.