

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan adalah neraca analitik, alat-alat gelas dasar, spatula, botol vial, lumpang alu, kertas saring membran selulosa nitrat, kertas saring membran PTFE, ultrasonik *Batch*, alat suntik (syringe), dan seperangkat HPLC merk Hitachi D-7000.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi KH_2PO_4 p.a, metanol p.a, asetonitril p.a, isopropil alkohol p.a, aquabides, standar parasetamol p.a, standar kafein p.a, tablet Bodrex (PT. Tempo Scan Pacifik), tablet Panadol Extra (PT. Sterling Products Indonesia), tablet Oskadon (PT. Supra Ferbindo Farma).

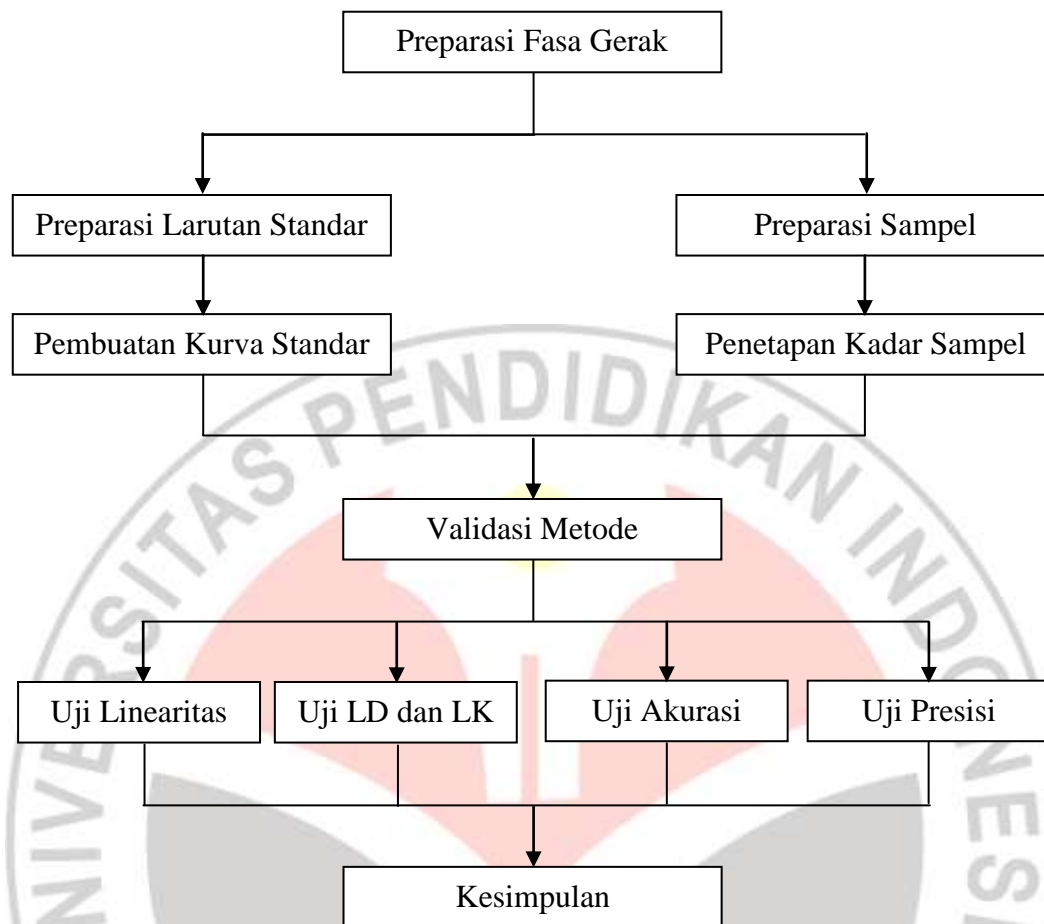
3.3. Metode Penelitian

Dalam melakukan penelitian ini diperlukan metode untuk mengarahkan dan memudahkan pelaksanaan pekerjaan. Berdasarkan rumusan masalah dan tujuan yang ingin dicapai seperti yang dirumuskan pada bagian pendahuluan maka disusun metodologi penelitian dengan tahapan yang saling terkait sebagai berikut:

- a. Preparasi fasa gerak yang meliputi penimbangan, pelarutan, pengocokan, dan penyaringan.
- b. Preparasi larutan standar, sampel (contoh) yang meliputi penimbangan, pelarutan, pengocokan, pengenceran, dan penyaringan.
- c. Penentuan parameter kerja metode (validasi metode) pada kondisi optimum menggunakan larutan standar parasetamol, larutan standar kafein, dan larutan sampel campuran parasetamol dan kafein. Dari langkah penelitian ini akan diperoleh data yang selanjutnya diolah secara statistik untuk memperoleh nilai linearitas, limit deteksi, limit kuantitasi, presisi (kecermatan), dan akurasi (ketepatan).
- d. Penentuan kelayakan metode berdasarkan nilai validasi yang dihasilkan.

3.4. Bagan Alir Penelitian

Secara umum, penelitian yang akan dilakukan dapat digambarkan melalui bagan berikut :



Gambar 5. Bagan Alir Penelitian.

3.5. Prosedur Kerja

3.5.1. Pembuatan Fasa Gerak

Sebanyak 420 mL KH_2PO_4 0,01 M, ditambahkan metanol 20 mL, ditambahkan asetonitril 30 mL, ditambahkan isopropil alkohol 30 mL, disaring menggunakan membran whatman filter PTFE 0,2 μm , disonikasi selama 30 menit.

3.5.2. Pembuatan Larutan Standar

Ditimbang seksama sejumlah 125 mg Parasetamol p.a dimasukkan kedalam labu 50 mL. Ditimbang seksama sejumlah 12,5 mg kafein p.a, dimasukkan kedalam labu 50 mL. Masing-masing kemudian ditambahkan pelarut sebanyak 20 mL, disonikasi selama 15 menit, diencerkan dengan pelarut hingga garis tanda sehingga diperoleh larutan standar campuran parasetamol 2500 ppm dan kafein 250 ppm, disaring. Filtratnya digunakan sebagai larutan induk.

3.5.3. Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar (Campuran Parasetamol dan Kafein)

Dipipet larutan standar parasetamol 2500 ppm sebanyak 0,4 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 ; 2 mL, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Dipipet larutan standar kafein 250 ppm sebanyak 0,4 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 ; 2 mL, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur yang telah terisi larutan standar parasetamol. Ditambahkan pelarut hingga garis tanda, dikocok, sehingga diperoleh konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 ppm Parasetamol dan 10, 20, 30, 40, 50 ppm Kafein. Kemudian masing-masing konsentrasi disaring dengan membran whatman PTFE 0,2 μ m, disonikasi selama 20 menit. Kemudian filtrat masing-masing konsentrasi diinjeksikan ke sistem HPLC dengan volume penyuntikan 10 μ l diukur pada panjang gelombang 215 nm. Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi

3.5.4. Preparasi sampel

Ditimbang 20 tablet, kemudian digerus, sejumlah serbuk ditimbang 125 mg, dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL, ditambahkan 15 mL pelarut, disonikasi selama 30 menit, diencerkan dengan pelarut hingga garis tanda sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 5000 ppm, dikocok lalu disaring, dibuang 5 mL filtrat pertama dan ditampung filtrat selanjutnya. Filtrat yang jernih digunakan sebagai larutan uji. Kemudian dari larutan ini dipipet 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan pelarut hingga garis tanda sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 500 ppm. Kemudian larutan disaring dengan membran whatman filter PTFE 0,2 μm atau yang lebih halus, lalu disonikasi selama 20 menit. Dinjeksikan filtrat sebanyak 10 μL ke dalam HPLC, dideteksi pada panjang gelombang 215 nm, laju alir 1 mL/menit kemudian dihitung kadarnya.

3.5.5. Penentuan Parameter Kinerja Validasi Metode

a. Uji Linearitas

Dibuat larutan standar campuran parasetamol dan kafein dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 ppm parasetamol dan 10, 20, 30, 40, 50 ppm kafein. Kemudian masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi yang telah ditentukan. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ($y = a + bx$) dimana a menyatakan intersep dan b adalah kemiringan garis dari deret larutan standar yang diukur. Linearitas kurva kalibrasi dilihat dari nilai koefisien korelasi (r).

b. Uji Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

Persamaan linear yang diperoleh pada uji linearitas selanjutnya digunakan untuk menghitung limit deteksi dan kuantifikasi (LD dan LK). LD dan LK dihitung dari rerata kemiringan garis dan simpangan baku intersep kurva standar yang diperoleh dengan rumus:

$$LD = 3,3 \frac{SD}{b} \qquad LK = 10 \frac{SD}{b}$$

Dengan

LD = Limit Deteksi (mg/L)

LK = Limit Kuantifikasi (mg/L)

SD = Standar Deviasi

b = slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

c. Uji Presisi

Dibuat larutan standar campuran parasetamol dan kafein dengan konsentrasi 500 ppm parasetamol dan 50 ppm kafein. Kemudian diukur dengan menggunakan KCKT sebanyak 6 kali ulangan di hari yang sama. Presisi dinyatakan dalam Residual Standar Deviasi (RSD%) dengan menggunakan rumus:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Dengan

SD = Standar Deviasi

RSD = Residual Standar Deviasi

Kriswanto, 2013

Pengembangan Dan Uji Validasi Metode Analisis Kadar Parasetamol Dan Kafein Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

\bar{x} = rerata kadar

d. Uji Akurasi

Akurasi diuji dengan metode penambahan standar. Disiapkan larutan sampel dengan konsentrasi 500 ppm yang telah diukur dan diketahui kadarnya. Serta dibuat larutan standar campuran parasetamol dan kafein dengan konsentrasi 500 ppm parasetamol dan 50 ppm kafein. Sebanyak 5 mL larutan standar campuran parasetamol dan kafein dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Kemudian ditambahkan dengan larutan sampel dengan konsentrasi 500 ppm, lalu diukur sebanyak 5 kali ulangan. Persen perolehan kembali dihitung dengan rumus:

$$\text{Persen perolehan kembali} = \frac{A-B}{C} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = konsentrasi contoh + konsentrasi standar yang terukur

B = konsentrasi contoh

C = konsentrasi standar teoritis yang ditambahkan