

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1 Pemeriksaan Mikroskopik Simplisia

Simplisia yang digunakan untuk penelitian ini dipastikan kebenaran identitasnya dengan melakukan pemeriksaan secara mikroskopik fragmen-fragmen penanda pada masing-masing simplisia yang diperoleh dari Farmakope Herbal tahun 2008.

4.2 Penyiapan Larutan Stok Pembeding

Baku pembeding parasetamol dan deksametason masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg. Masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan etanol hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok pembeding parasetamol dan deksametason dengan konsentrasi 1 mg/mL.

4.3 Pembuatan Jamu Simulasi Pegal Linu

Sebanyak 1,75 gram serbuk simplisia *Curcumae xanthorrhizae rhizoma*; 1,75 gram serbuk simplisia *Curcumae domesticae rhizoma*; 1,5 gram serbuk simplisia *Zingiberis officinalis rhizoma*, dicampur dan digerus di dalam mortar sehingga diperoleh campuran jamu simulasi dalam bentuk serbuk yang homogen.

4.4 Optimasi Preparasi EFP

4.4.1 Optimasi preparasi EFP I

Sebanyak 500 mg sampel jamu simulasi yang telah ditambahkan parasetamol dan deksametason ditambahkan 10 mL metanol. Kemudian campuran disaring, filtratnya diambil. Sebelumnya dilakukan pengondisian kolom EFP C-18 berturut-turut dengan 6 mL metanol dan 6 mL aquadestilata. Sebanyak 1 mL sampel jamu simulasi dimasukkan ke dalam kolom EFP dan dibiarkan menetes perlahan. Kemudian kolom dicuci dengan larutan pencuci metanol dan aquadest (60:40). Kemudian analit dielusi dengan metanol. Lalu dilakukan pemantauan menggunakan KLT. Optimasi kemudian dilakukan dengan menambahkan jumlah jamu simulasi yang diretensi menjadi sebanyak 3 mL.

4.4.2 Optimasi preparasi EFP II

Sebanyak 1 gram sampel jamu simulasi yang telah ditambahkan parasetamol dan deksametason ditambahkan 8 mL H_2SO_4 2,5% dalam air. Lalu dikocok menggunakan *shaker* selama 15 menit. Kemudian campuran disaring, filtratnya diambil. Sebelumnya dilakukan pengondisian kolom EFP C-18 berturut-turut dengan 1,5 mL metanol dan 1,5 mL aquadestilata. Sebanyak 800 μL sampel jamu simulasi dimasukkan ke dalam kolom EFP dan dibiarkan menetes perlahan. Kemudian kolom dicuci berturut-turut dengan 3 mL aquadest. Kemudian analit dielusi dengan 3 mL NH_4OH 2,5% dalam metanol. Lalu dilakukan pemantauan menggunakan KLT. Diujikan juga menggunakan pelarut asam format 2,5% dalam air dengan prosedur yang sama.

4.4.3 Optimasi preparasi EFP III

Sebanyak 1 gram sampel jamu simulasi yang telah ditambahkan parasetamol dan deksametason ditambahkan 8 mL asam format 5% dalam air. Lalu dikocok menggunakan *shaker* selama 15 menit. Kemudian campuran disaring, filtratnya diambil. Sebelumnya dilakukan pengondisian kolom EFP C-18 berturut-turut dengan 1,5 mL metanol dan 1,5 mL aquadestilata. Sebanyak 800 μ L sampel jamu simulasi dimasukkan ke dalam kolom EFP dan dibiarkan menetes perlahan. Kemudian kolom dicuci dengan 3 mL aquadest. Kemudian analit dielusi dengan 3 mL NH_4OH 2,5% dalam metanol. Lalu dilakukan pemantauan menggunakan KLT.

4.5 Uji Kualitatif dengan KLT

Larutan standar parasetamol, larutan standar deksametason, filtrat jamu simulasi, larutan sisa retensi, larutan hasil cucian, dan hasil elusi ditotolkan pada plat KLT GF₂₅₄ menggunakan pipa kapiler. Kemudian plat dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fasa gerak, lalu elusi menggunakan eluen kloroform-metanol (9:1) (v/v) hingga eluen mencapai tanda batas. Plat dikeringkan, lalu dilihat dibawah penampak bercak sinar UV 254 nm dan dibandingkan bercak ekstrak dengan standar.

4.6 Optimasi Sistem KCKT

Dilakukan penyuntikan standar parasetamol dan standar deksametason secara terpisah untuk melihat puncak yang dihasilkan. Untuk sistem KCKT,

digunakan kolom Zorbax ODS 4,6 mm ID x 250 mm (5 μ m), laju alir 1,5 mL/menit, detektor UV panjang gelombang 254 nm. Optimasi dilakukan dengan mengujikan beberapa perbandingan fase gerak (aquabides-metanol), yaitu perbandingan 75:25, 65:35, 40:60, 70:30, 60:40, 25:75 dan diujikan tipe elusi isokratik dan gradien.

4.7 Uji Kesesuaian Sistem KCKT

Campuran larutan standar parasetamol dan deksametason yang telah disiapkan disuntikkan sebanyak 7 kali kedalam alat KCKT dengan sistem kromatografi terpilih. Hasil rekaman kromatogram untuk masing-masing penyuntikkan kemudian dicatat luas area uji dan waktu retensinya. Nilai luas area uji dan waktu retensi kemudian dihitung simpangan baku relatifnya. Nilai simpangan baku relatif harus kurang dari 2,0%.