

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental laboratorium.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Lab Penelitian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu penelitian meliputi tahap persiapan, tahap pelaksanaan, pada bulan Februari 2019 – Juli 2019

#### **C. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Spektrofotometri UV – Vis (Jasco V-730®), Densitometer/TLC Scanner (Camag TLC Scanner 4®), silica gel GF 254 (Merck KGaA®), corong pisah (Pyrex®), timbangan analitik (Mettler Toledo®), kotak UV, pengaduk (Well Spencer®), beker glass (Pyrex®), labu ukur (Pyrex®), corong gelas (Pyrex®), pipet volume (Pyrex®), erlenmeyer (Pyrex®), cawan, pipa kapiler (Vitrex®), dan kompor listrik.

##### **2. Bahan**

Adapun bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu Caffein anhydrous yang didapatkan dari PT Brataco Yogyakarta, aquadestilasi (PT Brataco®), natrium karbonat/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (PT Brataco®),

etanol p.a (PT Brataco®), kloroform p.a/ $\text{CHCl}_3$  (PT Brataco®), dan suplemen pembakar lemak yang beredar di pasaran dengan merk dagang (HHE, CSHD, UR, HHNG, FBL-C) dan diberi label sampel nomor 1-5.

#### **D. Cara Kerja**

##### **1. Preparasi Sampel**

Sejumlah 2 gram sampel suplemen pembakar lemak dimasukkan ke dalam beker gelas dan dilarutkan dengan aquades mendidih sebanyak 100 ml, disaring, lalu filtrat ditambah, dan dimasukkan ke dalam corong pisah, dan diekstraksi dengan kloroform berturut-turut sebanyak 25 ml sebanyak empat kali. Filtrat yang didapat lalu ditampung dalam wadah. Cuplikan kloroform diambil untuk ditotolkan pada plat KLT.

##### **2. Analisis Kromatografi Lapis Tipis**

###### **a. Persiapan Plat KLT GF 254**

Sebelum digunakan, plat dipotong dengan ukuran 10 cm x 3 cm. Lalu diberi jarak tepi atas 1 cm dan tepi bawah 1 cm, ditandai dengan sedikit goresan pensil.

###### **b. Pembuatan Fase Gerak**

Fase gerak yang digunakan terdiri dari campuran kloroform p.a dan etanol p.a dengan perbandingan (9:1) mengikuti penelitian sebelumnya yang sudah dilakukan optimasi fase gerak.

###### **c. Pembuatan Larutan Baku Pembanding**

Pada labu ukur 10 ml dimasukkan serbuk kafein murni yang didapatkan dari PT Brataco Yogyakarta sebanyak 2 miligram. Lalu ditambahkan dengan kloroform ke dalam labu ukur sampai tanda batas.

d. Identifikasi pada KLT

Larutan baku pembanding dan larutan sampel yang sudah disiapkan sebelumnya, ditotolkan pada setiap plat KLT sebanyak 1 total menggunakan pipa kapiler pada 1 cm dari bawah plat.

e. Pengujian KLT

Dalam bejana kromatografi yang sudah dijenuhkan terlebih dahulu dimasukkan plat KLT selanjutnya ditunggu hingga elusi merambat pada plat KLT. Dilihat noda pada plat KLT dengan UV 254 nm, lalu diberi tanda pada noda. Kemudian dihitung nilai  $R_f$ , dan dibandingkan nilai  $R_f$  sampel dan  $R_f$  baku pembanding.

### 3. Analisis Kuantitatif dengan Densitometri

Pada plat KLT yang telah terbaca mengandung kafein selanjutnya akan dihitung kadarnya menggunakan densitometer. Plat KLT dimasukkan kedalam densitometer agar dideteksi dengan sinar UV panjang gelombang 254 nm. Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan regresi linier perhitungan untuk mendapatkan nilai persamaan kurva baku.

#### 4. Analisis Dengan Spektrofotometri UV – Vis

##### a. Penyiapan Larutan Stok

Sejumlah 100 mg standar kafein ditimbang seksama, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, dan dilarutkan dengan aquades lalu dicukupkan sampai tanda batas dengan aquades dan dikocok homogen, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm, larutan ini disebut larutan stok.

##### b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum dilakukan dengan cara mengambil 5 ml larutan stok ke dalam labu ukur 100 ml menggunakan pipet, lalu dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan baku 5 ppm. Tahap berikutnya adalah mengukur serapan pada panjang gelombang antara 270-300 nm menggunakan Spektrofotometer UV – Vis

##### c. Penentuan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dilakukan dengan membuat serangkaian larutan pembanding dengan konsentrasi 0; 2,5; 5; 7,5; 10; dan 12,5 ppm. Tahap ini dilakukan dengan cara mengambil larutan masing-masing sejumlah 0, 2,5; 5, 7,5; 10; dan 12,5 ml ke dalam labu ukur 100 ml dengan menggunakan pipet, lalu dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas. Langkah berikutnya adalah diukur serapannya menggunakan Spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang serapan maksimum dan sebagai blanko digunakan aquades.

#### d. Preparasi Sampel Spektrofotometri UV – Vis

Pelarut kloroform yang sudah ditampung di erlenmeyer, diuapkan dengan cara sublimasi pada cawan sehingga didapat ekstrak kafein. Ekstrak kafein yang dihasilkan selanjutnya dimasukan ke dalam labu ukur 100 ml dan dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas

### E. Analisis Data

Dari data yang diperoleh kemudian dideskripsikan melalui dengan tulisan dan olahan data secara jelas.

#### 1. Uji Kualitatif KLT

Spot noda yang sudah didapat di plat KLT, dihitung nilai Rf nya dengan rumus:

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Nilai Rf dari setiap sampel yang sudah didapat, kemudian dibandingkan dengan nilai Rf standar kafein murni.

#### 2. Uji Kuantitatif Densitometri

Plat KLT yang sudah diukur menggunakan densitometri atau TLC Scanner dilihat nilai luas area (AUC) dari setiap bercak yang terdapat di plat KLT. Nilai AUC tersebut dimasukkan kedalam persamaan linier yang sudah didapatkan dan didapatkan setiap konsentrasi dari sampel. Persamaan linier dari kurva baku dapat dilihat pada persamaan 2 (Gandjar dan Rohman, 2013) :

$$y = ax + b$$

Keterangan:

y : absorbansi

x : konsentrasi

a : titik potong pada sumbu Y

b : kemiringan atau *slope*

### 3. Uji Kuantitatif Spektrofotometri UV – Vis dan Penetapan Kadar

Sampel yang sudah dipreparasikan, diukur serapannya dan didapatkan nilai absorbansi dari setiap sampel. Dicatat setiap absorbansi yang sudah didapatkan, dimasukkan kedalam persamaan linier yang sudah dibuat dan didapatkan konsentrasi dari setiap sampel. Konsentrasi yang sudah didapatkan, dimasukkan kedalam rumus penetapan kadar. Kadar kafein dalam sampel dapat dihitung dengan cara sebagai berikut;

$$\text{Kadar kafein (mg/g)} = \frac{\text{Konsentrasi (mg/L)} \times \text{Volume (L)} \times Fp}{\text{Berat Sampel (g)}}$$