

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional laboratorium yang bertujuan untuk menganalisis kandungan andrografolid dalam produk herbal sambiloto. Metode yang digunakan meliputi Kromatografi Lapis Tipis-Spektrofotometri (KLT-Spektrofotometri) untuk identifikasi kualitatif dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) untuk analisis kuantitatif. Pendekatan yang diambil bersifat deskriptif analitik, di mana pengamatan dilakukan tanpa manipulasi sampel, dan data hasil analisis dibandingkan dengan standar andrografolid untuk menentukan validitasnya.

4.2 Instrumen Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua instrumen utama, yaitu *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan Kromatografi Lapis Tipis-Spektrofotometri (KLT-Spektrofotometri), untuk analisis kuantitatif dan kualitatif andrographolid dalam produk herbal sambiloto. HPLC dengan sistem pompa, kolom C18, dan detektor UV-Vis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur kandungan andrografolid secara akurat pada panjang gelombang tertentu (Abriyani *et al.*, 2024). Metode ini dipilih untuk hasil yang sensitif dan presisi. Sementara itu, KLT-Spektrofotometri, menggunakan plat KLT silika gel F254 dan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, digunakan untuk identifikasi kualitatif dengan analisis spektrofotometri berdasarkan intensitas bercak (F. L. Dewi *et al.*, 2024). Kombinasi kedua metode ini memungkinkan analisis komprehensif, di mana KLT-Spektrofotometri memberikan informasi awal dan HPLC memberikan hasil kuantitatif yang lebih akurat untuk standarisasi andrographolid dalam produk herbal sambiloto.

4.3 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah sampel bahan baku dan produk jadi herbal sambiloto.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah data absorbansi dan kadar andrografolid yang terukur.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Instrument PT.Mustika Ratu Tbk, Jl.Mustika Ratu No.21 11, Kec.Ciracas, Kota Jakarta Timur, Daerah Khusus Ibukota Jakarta.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei 2024 – Juli 2024

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 HPLC

4.5.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada metode HPLC untuk penelitian ini antara lain : *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Simadzu) dengan detektor UV-Vis, kolom C18, mikropipet, sonikator, alat timbang analitik (Shimadzu), vial sampel, komputer dengan perangkat lunak empower.

4.5.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada metode HPLC untuk penelitian ini antara lain : Standar Andrografolid dengan kemurnian $\geq 98\%$ (PT.Mark Herb), kapsul sambiloto (PT. Mustika Ratu, Tbk.) methanol (HPLC grade), dan aquadest.

4.5.2 KLT-Spektrofotometri

4.5.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada metode KLT-Spektrofotometri untuk penelitian ini antara lain : Spektrofotometri UV-Vis (Simadzu), plat KLT (silica gel F254), chamber KLT, pipet kapiler, alat timbang analitik.

4.5.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada metode KLT-Spektrofotometri untuk penelitian ini antara lain : Standar Andrografolid, simplisia sambiloto, ekstrak sambiloto, kaplet sambiloto, kapsul sambiloto, methanol, kloroform, dan kapsul sambiloto.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Prosedur dengan HPLC

a. Persiapan Larutan Standar

Standar andrografolid dengan kemurnian $\geq 98\%$ (Mark Herb) ditimbang dengan akurat menggunakan timbangan analitik. Larutan stok dengan konsentrasi 1110 ppm kemudian dibuat dengan melarutkan standar dalam metanol HPLC grade. Selanjutnya, dilakukan dilusi bertingkat untuk menghasilkan deret konsentrasi mulai dari 44,4 ppm hingga 888 ppm. Larutan-larutan ini kemudian digunakan untuk membuat kurva kalibrasi yang akan digunakan dalam analisis lebih lanjut.

b. Persiapan Sampel Uji

Sampel herbal sambiloto dalam bentuk kapsul diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan sonikator untuk memastikan kelarutan penuh senyawa target, sehingga diperoleh larutan yang homogen dan siap untuk dianalisis lebih lanjut.

c. Pengaturan Kondisi HPLC

Kolom C18 dengan ukuran 150 mm x 4,6 mm dan partikel 5 μm digunakan dalam analisis. Fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol dan air dengan rasio 60:40. Laju alir diatur pada 0,8 mL/menit, sementara deteksi dilakukan menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 229 nm untuk mengidentifikasi senyawa target dalam sampel.

d. Injeksi Sampel

Larutan standar dan sampel diinjeksikan ke dalam sistem HPLC dengan volume injeksi sebesar 20 μL . Sebelum dilakukan analisis, sistem dikalibrasi menggunakan larutan standar untuk memastikan akurasi pengukuran dan menentukan kadar andrografolid dalam sampel yang dianalisis.

e. Analisis Data

Data kromatografi berupa luas area puncak dihitung dan dibandingkan dengan kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasi andrografolid dalam sampel.

4.6.2 Prosedur dengan KLT-Spektrofotometri

a. Persiapan Sampel Uji

Sampel Simplisia, ekstrak, tablet, dan kapsul sambiloto diekstraksi menggunakan metanol sebagai pelarut. Setelah proses ekstraksi, larutan tersebut dilarutkan hingga homogen dengan menggunakan sonikator, untuk memastikan kelarutan penuh senyawa target yang akan dianalisis.

b. Aplikasi pada Plat KLT

Sampel diaplikasikan pada plat KLT silica gel F254 menggunakan pipet kapiler. Setiap konsentrasi diaplikasikan dalam jumlah yang sama untuk menghasilkan pita kromatografi yang jelas, yang memungkinkan pemisahan dan identifikasi senyawa target dalam sampel.

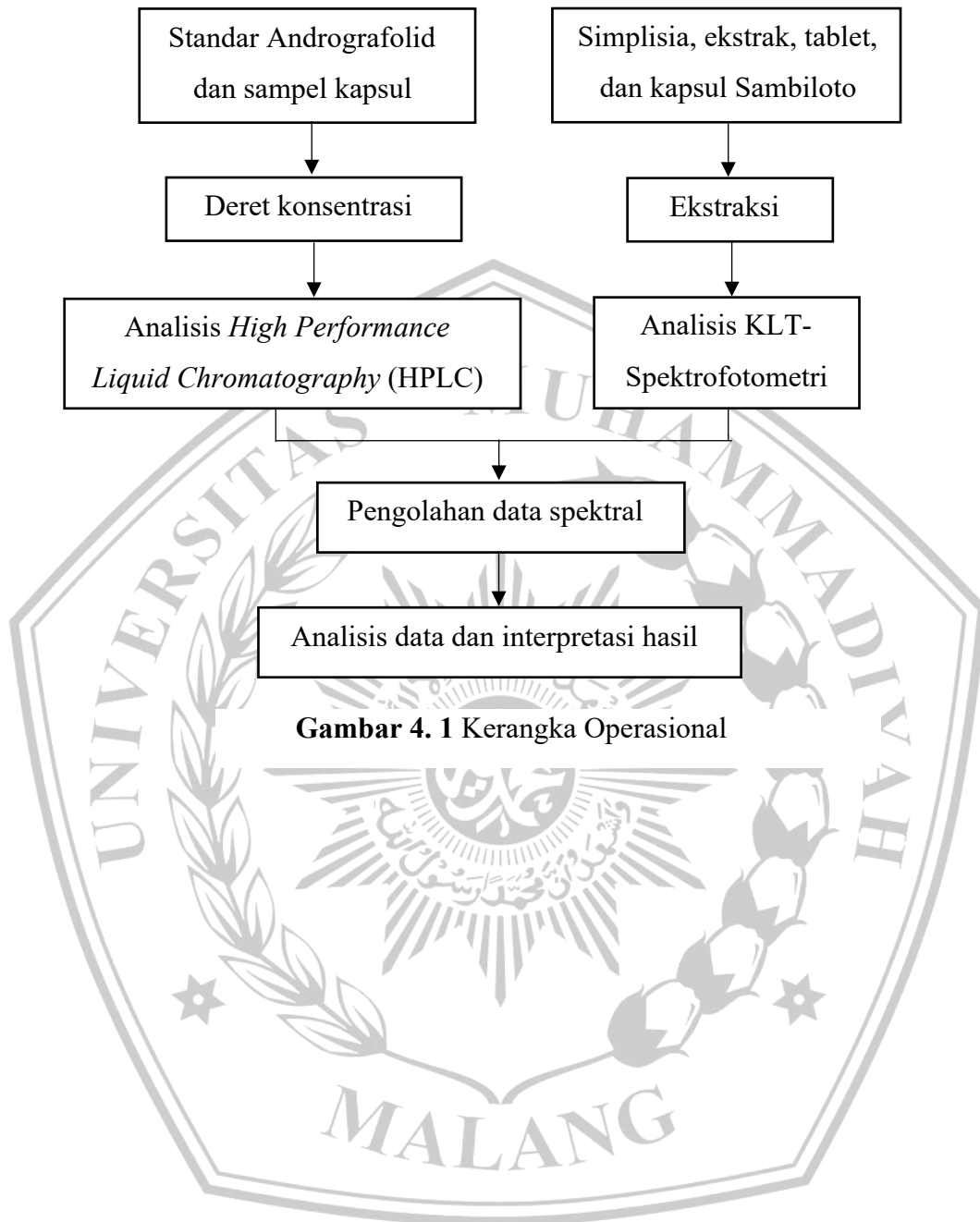
c. Pengembangan Plat KLT

Plat KLT dimasukkan ke dalam chamber yang berisi fase gerak berupa campuran kloroform-metanol (9:1), dan dibiarkan hingga senyawa-senyawa dalam sampel terpisah dengan baik. Setelah proses pemisahan selesai, plat dikeringkan terlebih dahulu sebelum dianalisis lebih lanjut untuk memastikan hasil yang akurat.

d. Analisis Spektrofotometri

Nilai R_f dihitung berdasarkan pola noda yang terbentuk pada pelat KLT. Pola noda yang telah terbentuk kemudian dikeruk dengan spatula dan masing-masing noda dipisahkan ke dalam vial. Selanjutnya, ditambahkan metanol sebanyak 5 mL, diikuti dengan proses sonikasi selama 10 menit, dan senyawa dipisahkan dengan silika. Filtrat yang mengandung senyawa terlarut kemudian diambil sebagai sampel untuk dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 229 nm. Hasil spektrum yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan spektrum standar andrografolid yang telah tervalidasi untuk memastikan keberadaan andrografolid dalam sampel.

4.7 Kerangka Operasional



Gambar 4. 1 Kerangka Operasional