

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Penelitian ini populasi yang digunakan adalah mencit yang memiliki berat berkisar $\pm 20-26$ gram.

2. Sampel

Penelitian ini menggunakan mencit sehat dan secara fisik terlihat baik yang diambil sampelnya adalah darah mencit.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Identifikasi variabel penelitian bertujuan untuk membantu dalam menemukan alat untuk mengumpulkan data dan teknik analisis data yang akan digunakan. Variabel utama dalam penelitian ini adalah kandungan etilen glikol dalam darah mencit setelah pemberian Sirup x.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama telah diidentifikasi, dapat dilanjutkan dengan diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yakni variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel utama yang mengalami perubahan untuk diteliti pengaruh atas perubahan yang terjadi pada variabel lainnya yaitu variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis sirup yang akan diberikan ke mencit dengan konsentrasi yang berbeda.

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel lainnya. Variabel ini keberadaannya dianggap merupakan suatu akibat dari adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah adalah konsentrasi atau kandungan etilen glikol dalam darah mencit.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, mencit adalah mencit galur *Swiss Webster* yang masih sehat dan masih terlihat baik secara fisik.

Kedua, sampel darah adalah sampel darah mencit diambil dari sinus orbital (mata) setelah pemberian sirup x yang mengandung etilen glikol.

Ketiga, identifikasi kandungan etilen glikol adalah identifikasi kandungan etilen glikol dalam darah menggunakan alat kromatografi gas.

Keempat, sirup x adalah sirup *unibebi cough* yang merupakan salah satu merek sirup yang menggunakan etilen glikol berdasarkan surat edarah BPOM no. 01.1.1.12.22.188.

C. Alat dan bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sonde oral, spuit, pipet volume, tabung reaksi, seperangkat alat sentrifugasi, vial, labu terukur, tabung EDTA seperangkat alat kromatografi gas, dan mikropipet.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah mencit, Unibebi cough syrup, metanol, dan baku etilen glikol.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan pengertian bahwa populasi sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit dengan berat ± 20 -25 gram.

2. Preparasi sampel uji

2.1 Penyiapan Sediaan Sirup. Sediaan obat sirup Unibebi Cough Syrup yang mengandung etilen glikol dibeli dari apotek pada Oktober 2023 di sekitar Solo yang belum dimusnahkan, kemudian disiapkan untuk diberikan kepada mencit, secara oral menggunakan sonde oral.

2.2 Pembagian Kelompok Mencit. Mencit akan dibagi ke dalam 3 kelompok. Masing-masing kelompok akan diinduksi secara oral menggunakan sediaan sirup *Unibebi cough syrup* yang mengandung etilen glikol dengan dosis yang berbeda-beda. Kelompok mencit 1 diberikan larutan sirup sebanyak 0,105 mL, kelompok 2 diberikan 0,135 mL, dan kelompok 3 diberikan 0,155 mL.

2.3 Pengambilan sampel darah mencit. Sampel darah mencit diambil 60 menit kemudian setelah diberi larutan sirup secara oral. Darah mencit diambil dari sinus orbital (mata) dengan menggunakan mikrohematokrit dan diambil sebanyak 0,1 mL menggunakan spuil 1 mL. Sampel darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung antikoagulan EDTA, ditambahkan metanol ad 5 ml, kemudian tabung diletakkan ke dalam alat sentrifugasi, dan diatur dengan kecepatan 3000

rpm (1 jam), kemudian diambil bagian bening yang merupakan plasma darah.

3. Pembuatan larutan baku

Ditimbang seksama lebih kurang 100 mg etilen glikol baku pembanding, dimasukkan kedalam labu terukur 100 mL, ditambahkan 50 mL pelarut metanol, disonikasi selama 5 menit, diencerkan dengan pelarut metanol sampai tanda dab dibuat kurva kalibrasi seri baku dibuat 6, 8, 10, 12 dan 14 ppm menggunakan labu takar 50 mL diperoleh pipetasi baku induk 0,3; 0,4; 0,5; 0,6, dan 0,7 mL.

4. Pembuatan larutan uji

Disiapkan kurang lebih 0,5 mL sampel, dimasukkan ke dalam labu terukur 5 mL, ditambahkan 3 mL metanol, disonikasi selama 5 menit, diencerkan dengan metanol sampai tanda, dan disaring dengan penyaring membran dengan porositas 0,25 μm (BPOM, 2023).

5. Optimasi kromatografi gas

Pelarut, larutan baku dan larutan uji masing-masing diinjeksikan ke dalam kromatografi gas. Sistem kromatografi mengikuti BPOM (2023) dengan modifikasi fase gerak, sebagai berikut:

Kolom	: DB wax UI (atau yang setara) dengan panjang 30m, diameter dalam 0,25 mm, <i>film thickness</i> 0,25 μm berisi polietilen glikol.
Detektor	: FID (<i>Flame Ionization Detector</i>) Suhu injektor 220 ⁰ C, suhu detektor 250 ⁰ C. Suhu awal 100 ⁰ C ditahan 4 menit, kenaikan suhu 50 ⁰ C/menit sampai 220 ⁰ C ditahan 6 menit.
Fase gerak	: Hidrogen
Laju alir gas	: 0,65 mL/menit
Split Ratio	: 10:1
Vol penyuntikan	: 1 μL (BPOM, 2023).

E. Analisis Hasil

1. Interpretasi Hasil

Interpretasi hasil dilakukan dengan menghitung konsentrasi dan kadar etilen glikol. Untuk konsentrasi akan dilihat dari nilai luas puncak sampel digunakan untuk menghiung kadar sampel melalui rumus persamaan garis regresi kurva baku $y = a + bx$. Hitung persamaan kurva baku $y = a + bx$, menggunakan hubungan data konsentrasi dengan luas

puncak (Sudarma dan Subhaktiyasa, 2021). Hitung konsentrasi etilen glikol (x ppm) dalam larutan uji menggunakan rumus:

$$X = \frac{(y-b)}{a}$$

Perhitungan kadar etilen glikol dalam sampel dihitung berdasarkan rumus:

$$\% \text{ Kadar sampel} = \frac{C \text{ reg} \times \text{Vol pembuatan}}{\text{Vol.sampel darah}} \times 100\%$$

Keterangan:

C reg : Konsentrasi regresi (g/ml)

Vol pembuatan : Volume pembuatan (ml)

Volume sampel darah : Volume sampel darah (ml)

2. Validasi Metode

2.1 Uji Linearitas. Uji linearitas menggunakan persamaan regresi linear konsentrasi vs luas puncak yang didapatkan dari interpretasi hasil. Linearitas metode dapat menggambarkan ketelitian pengerjaan analisis suatu metode, dihitung dengan nilai koefisien relasi (r) melalui persamaan $y = a + bx$ antara konsentrasi standar dan luas area. Koefisien korelasi (r) diterima jika nilai $r > 0,995$ atau mendekati 1 (Handayani *et al.*, 2022).

2.2 Uji *Limit of Detection* (LOD). Penentuan limit deteksi dapat dihitung berdasarkan rumus (Handayani *et al.*, 2022) :

$$\text{LOD} = \frac{K \times Sb}{Sl}$$

Keterangan:

K : 3 untuk batas deteksi

Sb : Standar deviasi respon analit

Sl : Arah garis linear kurva antara respon terhadap konsentrasi = kemiringan (b terhadap persamaan garis $y = a + bx$).

LOD (batas deteksi), karena $K=3$, simpangan baku (Sb) = Sy/x , maka:

$$\text{LOD} = \frac{3sy/x}{Sl}$$

2.3 Uji *Limit of Quantation* (LOQ). Penentuan limit kuantisasi dapat dihitung dengan rumus (Handayani *et al.*, 2022) :

$$\text{LOD} = \frac{K \times Sb}{Sl}$$

Keterangan:

K : 10 untuk batas kuantisasi

Sb : Standar deviasi respon analit

Sl : Arah garis linear kurva antara respon terhadap konsentrasi = kemiringan (b terhadap persamaan garis $y = a + bx$).

LOD (batas deteksi), karena $K=3$, simpangan baku (Sb) = Sy/x , maka:

$$\text{LOD} = \frac{10sy/x}{Sl}$$

2.4 Uji Akurasi. Penentuan akurasi dilakukan dengan membuat larutan standar/baku dengan menggunakan konsentrasi larutan standar etilen glikol yaitu 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Masing-masing larutan standar diambil 1 mL, dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan pelarut sampai tanda batas, lalu diinjeksikan pada kromatografi gas sebanyak masing-masing 3 kali ulangan. Suatu metode dikatakan valid jika nilai *%recovery* dari suatu standar menunjukkan angka antara 50-120% (Rahmadilla, 2020). Rumus penentuan pada uji akurasi adalah (Handayani *et al.*, 2022):

$$\%Recovery = \frac{\text{Konsentrasi terukur}}{\text{Konsentrasi teoritis}} \times 100 \%$$

2.5 Uji Presisi. Penentuan presisi dilakukan dengan membuat larutan standar etilen glikol 6 ppm, diambil 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan pelarut sampai tanda batas, diinjeksikan ke dalam kromatografi gas sebanyak 6 kali ulangan (Rahmadilla, 2020), koefisien variasi yang baik tidak boleh lebih dari 2%. Presisi dicari dengan rumus (Handayani *et al.*, 2022):

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

Keterangan:

SD : Nilai standart deviasi

RSD : Nilai *Relative Standard Deviation*

\bar{x} : Rata-rata pengukuran

RSD menunjukkan ketelitian dari metode uji:

$RSD \leq 1\%$ (sangat teliti)

$1\% < RSD \leq 2\%$ (teliti)

$2\% < RSD \leq 5\%$ (ketelitian sedang)

$RSD > 5\%$ (tidak teliti).

F. Skema Penelitian

