

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) menggunakan pengujian kualitatif dengan LC-MS/MS.

1.2. Sampel

Sampel yang digunakan ialah daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) yang didapat dari lingkungan hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser, Sumatera Utara. Kemudian daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) dimaserasi lalu dikentalkan menjadi ekstrak etanol daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) dan dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator* setelah dipekatkan lalu diuapkan menggunakan *Water bath*. Kemudian ekstrak etanol daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*) yang sudah diuapkan diambil sebanyak 0,5 g lalu dilarutkan menggunakan *asetonitril*. Kemudian disaring menggunakan membrane filter GHP/PTFE 0,22 μ m, diambil filtrat sebanyak 5 μ L lalu diinjeksikan kedalam instrument untuk dilakukan identifikasi senyawa menggunakan LC-MS/MS.

1.3. Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1. Bahan

Bahan penelitian yang digunakan untuk penelitian ini ialah Daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*), kertas saring, etanol 70%, asam klorida, asam format, *asetonitril*, kertas saring bebas abu, dan aquadest.

3.3.2. Alat

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini ialah timbangan analitik, batang pengaduk, *beaker glass* (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), labu ukur (Pyrex), *vacum pump* elektrik, corong buchner, cawan porselin, cawan krus, botol kaca coklat, vial, *rotary evaporator* (Eyela), *waterbath* (Memmert), spatula, LC-MS/MS (Waters), kolom *Acquity UPLC HSS C18 1.8 μm* (2,1×150 mm), membran filter GHP/PTFE 0,22μm dan sonikator.

1.4. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan kurang lebih selama bulan Januari-Mei 2022 bertempat di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang, PT *Saraswanti Indo Genetech* dan determinasi dilakukan di Herbarium Jatinangor Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UNPAD.

1.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pembuatan Ekstrak Etanol daun Cep-cepan

Ekstraksi yang digunakan dengan cara dingin yakni maserasi dengan pelarut etanol 70%. Prosedur maserasi sendiri dilakukan dengan merendam serbuk tumbuhan sebanyak 1000 gram dengan etanol 70% sebanyak 10 liter ke dalam tempat inert yang tertutup rapat terhindar dari cahaya matahari pada suhu kamar selama 72 jam dan sesekali diaduk secara konsisten dan kontinu. Ekstrak cair disaring dan pekatkan di *Rotary evaporator* (Eyela OSB-2100) pada suhu 50° C lalu dikentalkan di *waterbath* (Memmert) dengan temperatur 40° C sambil diaduk hingga didapat ekstrak kental. Dihitung persentase rendemen ekstrak yang diperoleh (Sarker *et al.*, 2006; Alkandahri *et al.*, 2019)

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat bahan yang diekstraksi}} \times 100$$

3.5.2. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia ekstrak daun Cep-cepan (*Castanopsis costata*)

a. Pemeriksaan Fenolik

Sampel sebanyak 0,5 gram ditimbang kemudian ditetaskan FeCl_3 , adanya senyawa golongan fenolik ditandai dengan warna hijau atau hijau kebiruan (Dewatisari WF *et al.*, 2017)

b. Pemeriksaan Alkaloid

Sample sebanyak 1 gram ditimbang kemudian dilarutkan dengan ammonia, menambahkan 5 mL kloroform kemudian gerus hingga homogen. Larutan sampel disaring dan masukkan kedalam tabung. Tambahkan asam klorida 2N lalu kocok kuat hingga membentuk 2 lapisan. Membagi sampel menjadi 3 bagian yaitu bagian ke-1 ditambahkan pereaksi mayer, terbentuknya endapan putih atau kekeruhan. Pada bagian ke-2 ditambahkan pereaksi dragendroff, terbentuknya endapan jingga atau coklat dan bagian ke-3 yaitu sebagai blanko (Fikayuniar, 2020).

c. Pemeriksaan Flavonoid

Sample sebanyak 1 gram ditimbang kemudian dilarutkan kedalam 50 mL air panas. Menambahkan sedikit serbuk Magnesium dan 5 mL asam klorida 2N kedalam filtrat tersebut. Tambahkan larutan amilalkohol kocok kuat hingga terjadi pemisahan. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna warna kuning hingga merah (Fikayuniar, 2020).

d. Pemeriksaan Saponin

Sample sebanyak 0,5 g dipanaskan dalam 50 mL air panas selama 15 menit, dinginkan kemudian saring. Kocok filtrat selama 10 detik hingga terbentuk busa kemudian tambahkan asam klorida, diamkan selama 10 menit. Adanya saponin ditandai dengan busa yang terbentuk tidak hilang setelah didiamkan selama 10 menit (Fikayuniar, 2020).

e. Pemeriksaan Tanin

Sample sebanyak 0,5 gram kemudian menambahkan air panas sebanyak 10 mL, tetesi FeCl_3 1%. Adanya tannin ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (Ningsih DW *et al.*, 2020)

f. Pemeriksaan Glikosida

Sampel ditambahkan campuran etanol 96% dengan air (7:3) dan asam klorida 2 N hingga terendam, direfluks selama 1 jam, didinginkan dan disaring. Selanjutnya filtrat ditambahkan aquadest dan timbal (II) asetat 0,4 M, diaduk, didiamkan hingga endapan turun lalu saring. Filtrat disari dengan campuran kloroform dan isopropanol dengan perbandingan 2:3 di dalam corong pisah, dikocok hingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan atas (gula) dan lapisan bawah (non gula).

1. Lapisan atas

Dilakukan dengan penambahan air dan pereaksi *Molish*, selanjutnya tambahkan asam sulfat pekat melalui dinding tabung secara perlahan-lahan, adanya ikatan gula ditandai dengan adanya cincin warna coklat/coklat keunguan/ungu pada batas antara kedua cairan.

2. Lapisan bawah

Dilakukan dengan penambahan *pereaksi Lieberman-Bouchard*. Bila terbentuk warna ungu kemerahan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna biru hijau/hijau menunjukkan adanya steroid (Farnsworth, 1966).

g. Pemeriksaan Glikosida Antarkuinon

Sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditambah etanol hingga terendam kemudian tambahkan asam sulfat 2 N, panaskan sebentar, setelah dingin kemudian masukkan ke dalam corong pisah tambahkan 10 ml benzena, dikocok dan didiamkan. Lapisan benzena dipisahkan dan disaring, kocok lapisan benzena dengan 2 ml larutan natrium hidroksida 2 N, diamkan. Adanya glikosida antarkuinon ditandai dengan lapisan natrium hidroksida berwarna merah (Farnsworth, 1966).

3.5.3. Standarisasi Ekstrak

Standarisasi ekstrak terdiri atas dua parameter, yaitu parameter spesifik dan non spesifik (Depkes, 2000).

a. Parameter spesifik

- Identitas

Mendeskripsikan nama ekstrak, nama latin, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama Indonesia yang digunakan berdasarkan pustaka standar dengan cara determinasi tumbuhan (Ulfah *et al.*, 2020).

- Organoleptik

Mendeskripsikan mulai dari bentuk, bau, rasa dan warna dengan panca indra (Depkes, 2000)

b. Parameter non spesifik

- Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan metode gravimetri dengan cara menimbang ekstrak kurang lebih sebanyak 1 gram, dioven selama 5 jam dengan temperature 105°C kemudian timbang (Syukri *et al.*, 2020). Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\%Kadar\ Air = \frac{W1 - W2}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W1 = berat sebelum pengeringan

W2 = berat akhir

- Kadar Abu Total

Kadar abu dilakukan menggunakan metode gravimetri dengan cara menimbang ekstrak kurang lebih sebanyak 1 gram kedalam krus yang telah ditara, lalu dipijarkan dengan temperatur hingga $600 \pm 25^\circ\text{C}$. Kemudian dinginkan dalam desikator, serta timbang berat abu yang diperoleh (Anam, et al., 2013; Fikayuniar, 2020).

Kadar abu dapat dihitung dengan rumus:

$$\%Kadar\ Abu\ total = \frac{W2 - W0}{W1} \times 100\%$$

- Kadar Abu Tidak Larut Asam

Penentuan kadar abu tidak larut asam dilakukan menggunakan metode gravimetri dengan cara mendidihkan abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu dengan HCl encer sebanyak 25 mL selama 5 menit, mengumpulkan bagian yang tidak larut asam kemudian saring menggunakan kertas saring bebas abu, filtrat cuci dengan air panas, kemudian melakukan pemijaran pada tanur dan timbang (Anam, et al., 2013; Fikayuniar, 2020). Kadar abu tidak larut asam dapat dihitung dengan rumus:

$$\%Kadar\ Abu\ Tidak\ Larut\ Asam = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

3.5.4. Identifikasi *Castanopsis costata* menggunakan LC-MS/MS

Ekstrak *Castanopsis costata* sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan 10 mL asetonitril, lalu disaring dengan membrane filter GHP/PTFE 0,22 μm .

Filtrat sebanyak 5 μ L diinjeksikan ke dalam instrument UPLC-QToF-MS/MS (*Ultra Pressure Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry*). Analisis LC-MS/MS dilengkapi dengan pompa *biner* dan LC dihubungkan ke Spektrometer Massa *Quadrupole Time-of-Flight* (QToF) dilengkapi dengan *ion source* ESI. Kolom LC yang digunakan Acquity UPLC HSS C18 1.8 μ m (2,1 \times 150 mm). 0,1% asam format dalam *asetonitril* (A) dan 0,1% asam format dalam akuabides ialah yang digunakan sebagai eluen.

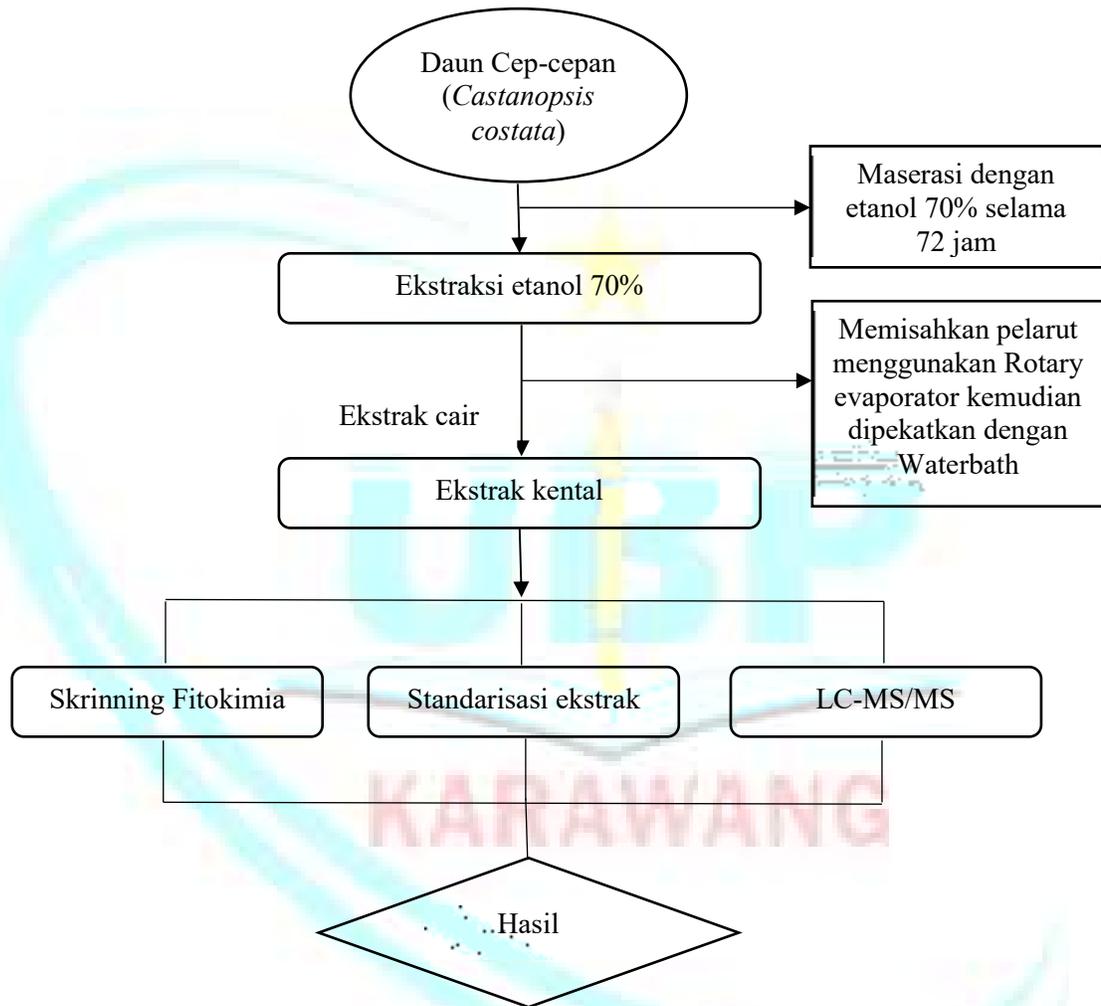


Tabel 3 1 Spesifikasi Instrumen UPLC-QToF-MS/MS

UPLC	
Alat	<i>Acquity UPLC (Waters)</i>
Kolom	<i>Acquity HSS C18 1.8 μm (2,1×150 mm)</i>
Eluen	A = 0,1% asam format dalam 99,9% <i>asetonitril</i> B = 0,1% asam format dalam 99,9% aquabidest
Flow rate	0,6 mL/menit
Metode elusi	Gradien
MS	
Alat	Xevo G2-S QTOF (Waters)
Sumber ion	ESI (<i>Electrospray Ionization</i>) positif (+) dan ESI <i>negative</i> (-)
Analisa	QTOF (<i>Quadrupole and Time-of-Flight</i>)

1.6. Skema penelitian

Berikut ini merupakan skema penelitian:



Gambar 3 1 Skema Penelitian