

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Pada penelitian Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium bahan alam farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang untuk mengetahui standarisasi, uji fisikokimia, uji kandungan senyawa, pada Ekstrak Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq. Penelitian deskriptif kuantitatif hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk angka (misalnya kadar air, kadar flavonoid, kadar fenolik, dan lain-lain).

3.2 Populasi Dan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Ekstrak Etanol Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq. Menggunakan ekstrak etanol 70%. Sampel diperoleh dari balai penelitian tanaman rempah dan obat (BALITTRO).

3.3 Alat Dan Bahan

3.3.1 Alat Yang Digunakan Pada Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Beaker glass*, timbangan analitik, pipet tetes, cawan porselen, alat-alat gelas (Pirex), botol kaca, Maserator, blender, LC- MS, hot plate, oven, *rotary evaporator*, krus porsen, tanur, vial, mesh NO. 40, corong, loyang, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kurs.

3.3.2 Bahan Yang Digunakan Pada Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Simplisia dari *Begonia x erythrophylla* Herincq yang telah dikeringkan dan dihaluskan. Pelarut n-heksana, etil asetat, etanol 70%, Aquadest, pereaksi mayer, pereaksi dragendroff, mg, HCl 2N, amil alkohol. asam klorida 2M,

FeCl_3 , asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat dan CHCl_3 , Vanilin sulfat 10%, Lieberman Buchard, Kertas saring. Alumunium foil.

3.4 Tempat Dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboraturium Kimia Farmasi dan Laboraturium Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dimulai dari Februari– Juni 2025.

3.5 Prosedur kerja

3.5.1 Pembuatan Simplisia Daun Begonia

Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq segar dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran yang melekat, kemudian di keringkan dengan di simpan dibawah terik matahari dengan ditutup kain hitam selama satu hari. Diambil sebanyak 1 kg simplisia kering. Simplisia kering dihaluskan dengan blender untuk memperbesar luas permukaan, sehingga senyawa aktif di dalamnya lebih mudah terekstraksi. Serbuk kemudian diayak untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam yaitu Mesh No.40. Serbuk yang telah diperoleh diletakkan pada wadah tertutup rapat dengan suhu kamar supaya mencegah terjadinya kontaminasi dan kerusakan senyawa aktif

3.5.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Begonia

Simplisia yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam maserator dan kemudian pelarut etanol 70% dimasukkan, sampel direndam dalam waktu 1x24 jam dan diaduk sesekali, kemudian ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan ulangi ekstraksi hingga hasil larutan ekstraksi tidak berwarna lagi. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% disatukan dan dipekatkan dengan rotary evaporation sampai mendapatkan ekstrak kental etanol 70%, kemudian dihitung nilai dari rendemen ekstrak kental pelarut etanol 70% (Abriyani, 2016).

Ekstraksi menggunakan etanol 70% diuapkan dan dilakukan proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perlakuan yang sama seperti ekstraksi dengan pelarut sebelumnya. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% disatukan dan dipekatkan kemudian dihitung rendemen ekstrak yang didapat (Abriyani, 2016). Setelah ekstrak kental didapatkan dihitung rendemen ekstrak yang didapat menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

Persen rendemen merupakan perbandingan berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat simplisia sebagai bahan baku. Semakin tinggi hasil nilai pada persen rendemen menunjukkan bahwa ekstrak yang dihasilkan semakin besar. Nilai persen rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya yaitu tumbuhan. Semakin tinggi persen rendem ekstrak maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik ada pada suatu ekstrak. Tujuan persen rendemen ekstrak dihitung yaitu untuk menghitung rasio antara bobot ekstrak kental dan bobot serbuk simplisia yang diekstraksi sesuai (Falestin *et al.*, 2024). Persen Rendemen dikatakan baik jika nilainya lebih dari 10% (Meianti & Manalu., 2022).

3.6 Skrining Fitokimia

3.6.1 Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menimbang 1gram sampel, menambahkan dengan tetesan NH_3 , menghaluskannya, lalu menambahkan 5 ml kloroform dan menyaringnya. Filtrat yang dihasilkan dicampur dengan beberapa tetesan asam sulfat 2M, dikocok, dan dipisahkan menjadi dua lapisan. lapisan asam kemudian dibagi ke dalam 3 tabung reaksi dan ditambahkan Pereaksi Dragendrof, Mayer, dan Wagner. Uji dianggap

positif jika terbentuk endapan merah jingga dengan Dragendrof, putih dengan Mayer, dan coklat dengan Wagner.

3.6.2 Flavonoid

Sebanyak 10 ml filtrat dicampurkan dengan serbuk magnesium, kemudian ditambahkan 0,2 ml HCl pekat dan amil alkohol. Setelah dikocok, campuran dibiarkan hingga terpisah. Adanya senyawa flavonoid di tunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

3.6.3 Saponin

Langkah-langkah dilakukan dengan mengocok 10 ml filtrat dalam tabung reaksi yang tertutup selama 10 detik, kemudian membiarkannya selama 10 menit. Adanya saponin di indikasikan oleh terbentuknya busa yang stabil.

3.6.4 Tanin

Proses ini dilakukan dengan menambahkan beberapa tetesan FeCl_3 1 % ke dalam 10 ml filtrat. Kehadiran tanin diidentifikasi melalui terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman.

3.6.4 Kuinon

Larutan dari tabung uji tanin (yang tidak mengendap) diambil dan dipindahkan ke Tabung Reaksi lain kemudian ditambahkan KOH. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya Kuinon (Purwanti NU, Yuliana S, Sari N., 2018).

3.6.5 Polifenolat

Dibuat Stok Sampel dengan cara dididihkan 50 mg ekstrak dalam 50 ml air selama 15 menit, lalu dinginkan serta disaring. Diambil sejumlah sampel,

ditambah beberapa tetes FeCl_3 1%. Perubahan warna menjadi biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa polifenol (Wahid AR, Safwan.S.,2020).

3.6.6 Tripernoid dan steroid

Prosedur dilakukan penimbangan 1 gr Sampel, Kemudian menambahkan dengan Etanol panas sambil diaduk, lalu disaring. Filtrate yang diperoleh dilakukan pemanasan sampai kering. Selanjutnya, Ditambahkan 1 tetes H_2SO_4 Pekat serta 1 tetes CH_3COOH anhidrat. Kehadiran Steroid ditunjukkan dengan warna hijau atau biru, sementara warna ungu dan warna merah yang meberikan tanda bahwa sampel positif memiliki Triterpenoid.

3.7 Parameter-Parameter Standarisasi

3.7.1 Parameter Spesifik

1. Identifikasi (determinasi)

Pendeskripsian tata diantaranya nama-nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama Indonesia tumbuhan (Depkes, 2000).

2. Organoleptik

Pengujian organoleptik ekstrak etanol daun (*Begonia x erythrophylla* Hérincq.) dilakukan secara visual untuk mengetahui mengenai bentuk, warna, dan bau dari ekstrak etanol daun (*Begonia x erythrophylla* Hérincq) (Depkes,2000).

3. Kadar Sari Larut Dalam Air

Timbang 2g ekstrak, kemudian dimeserasi dengan 100ml air-kloroform (kloroform 2,5ml, dan kloroform 97,5ml) selama 24 jam dalam labu

erlemenyer 100ml, sesekali dikocok selama 6 jam pertama didiamkan 18 jam, saring cepat, ambil filtratnya sebanyak 20ml, uapkan 25,0 ml filtrat dalam cawan dangkal (yang telah ditara) diatas tengkas air hingga kering/waterbath, lalu panaskan residu pada oven dengan suhu 105°C hingga bobot tetap.

Rumus penentuan rata-rata kadar sari larut air =

$$\frac{w_2 + w_2 + w_3}{3} - w_0 \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad \dots (1)$$

Keterangan:

W_0 = cawan kosong

W_2 = bobot konstan

W_3 = bobot konstan akhir

Rumus penentuan % kadar sari larut air

$$\frac{w_3 - w_0}{w_1 - w_0} \times 100\% \quad \dots (2)$$

Keterangan:

w_0 = bobot cawan kosong

w_1 = bobot setelah waterbath

w_2 = bobot konstan

w_3 = bobot konstan akhir

4. Kadar Sari Larut Etanol

Timbang 2g ekstrak, kemudian dimeserasi dengan etanol 70% sebanyak 100ml, masukkan dalam labu erlemenyer 100ml, sesekali dikocok

selama 6 jam pertama, didiamkan 18 jam, saring cepat (mencegah etanol menguap) ambil filtratnya sebanyak 20ml. air hingga kering, lalu panaskan residu pada oven dengan suhu 105°C hingga bobot tetap.

3.7.2 Parameter Non Spesifik

1. Susut Pengeringan

Timbang seksama 1 gram - 2gram ekstrak, masukkan ke dalam cawan penguap yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 3 menit, dan telah ditara. Jika zat uji berupa hablur besar gerus dengan cepat hingga ukuran butiran lebih kurang 5mm sampai 10 mm dan timbang segera. Lalu ratakan zat dalam cawan penguap, kemudian dimasukkan kedalam oven suhu 105°C selama 3 jam hingga bobot tetap, masukkan cawan penguap kedalam eksikator (desikator) lalu biarkan hingga dingin, masukkan lagi pada oven dengan suhu 105°C selama 1 jam. Kemudian ulangi secara yang sama hingga (f) bobot tetep, bila pergerakan hasil penimbangan tak lebih dari 0,5m/g, sampel maka anggap bobot tetap. Jika rendah dari 105°C, lalukan pengeringan mula-mula pada suhu antara 5°C sampai 10°C, dibawah suhu leburnya selama 1 jam sampai 2 jam, kemudian lanjutkan pengeringan pada suhu 105°C hingga bobot tetap.

$$\% \text{ susut pengeringan} = \frac{b - (c - a)}{b} \times 100\% \quad \dots (3)$$

Keterangan:

b = berat sampel (gram)

c = berat cawan + sampel

a = berat sampel cawan (Depkes, RI, 2000).

2. Bobot Jenis

Timbang piknometer kosong ukuran 25 mL, kemudian piknometer diisi dengan aquades hingga penuh dengan ditimbang ditetapkan ulang air kerapatan kemudian dan dapat air. Piknometer kosong diisi penuh dengan ekstrak cair yang telah diencerkan sebanyak 5% dengan air, lalu ditimbang dengan ekstrak berat yang mempunyai volume 25 ml pada suhu 25°C, Sehingga dapat ditetapkan kerapatan ekstrak (Depkes RI,2000).

Rumus penentuan bobot jenis:

$$\frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1} \dots (4)$$

Keterangan:

w_3 : bobot piknometer + ekstrak cair (g)

w_1 : bobot piknometer + kosong (g)

w_2 : bobot piknometer + aquades (g)

3. Kadar Air (Metode Gravimetri)

Pada uji kadar air menggunakan metode gravimetri dimana timbang 2gram ekstrak, kemudian dimasukkan ke dalam cawan uap yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit, setelah itu di dinginkan dalam desikator 30 menit, lalu masukkan ekstrak yang sudah di timbang 2 gram. Setelah itu Cawan uap dimasukkan ke dalam oven dalam keadaan cawan terbuka, setelah itu di dinginkan pada 30 menit, hingga bobot tetap, didinginkan dalam desikator. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali kemudian dihitung presentasenya (Kemenkes RI, 2017).

Rumus pentuan rata-rata kadar air (menggunakan metode gravimetri)

$$\frac{w_2 + w_2 + w_3}{3} - w_0 \times 100\% \quad \dots (5)$$

Keterangan:

w = sampel (g)

w_0 = cawan kosong (g)

w_2 = bobot konstan (g)

w_3 = bobot konstan akhir (g)

Rumus penentuan % kadar air:

$$rumus = \frac{w_1 - w_3}{w_1 - w_0} \times 100\% \quad \dots (6)$$

w_0 = cawan kosong (g)

w_1 = cawan + ekstrak (g)

w_3 = bobot konstan akhir (g)

4. Kadar Abu Total

Timbang 3gram ekstrak yang telah di gerus dan ditimbang seksama, kemudian dimasukkan kedalam krus silikat atau krus platina yang telah dipijarkan (diarangkan) menggunakan hot plate hingga meng-arang dan tara, lalu serbuk diratakan. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga suhu 500-600°C hingga arang abis atau abu habis pada tanur (furnace), selanjutnya didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan timbang hingga bobot tetap.

Rumus penetapan kadar abu total:

$$\frac{w_2 - w_0}{w_1 - w_0} \times 100\% \quad \dots . (7)$$

Keterangan:

w_0 = bobot krus kosong (g)

w_1 = bobot krus + ekstrak (g)

w_2 = bobot konstan akhir (g)

5. Kadar Abu Larut Dalam Air

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25ml air selama 5 menit, kemudian kumpulkan bagian yang air, saring melalui krus kaca mesir atau kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan pada hot plat selama 15 menit, kemudian pemijaran dilanjutkan pada tanur dengan suhu 500°C. hingga bobot tetap.

Rumus penentuan kadar abu larut dalam air:

$$\text{rumus} = \frac{\text{berat abu larut air } (w_3)}{\text{berat ekstrak } (g)} \times 100\% \quad \dots . (8)$$

Keterangan:

w = sampel (g)

w_3 = berat kadar abu larut air (g)

6. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25ml asam sulfat encer selama 5 menit, lalu dikumpulkan bagian yang tidak larut asam, saring melalui krus kaca mesir atau kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan pada hot plate selama 15 menit,

kemudian pemijaran dilanjutkan pada tanur dengan suhu kurang lebih 450°C hingga bobot tetap.

Rumus penentuan kadar abu tidak larut asam:

$$\text{rumus} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam (g)}}{\text{berat ekstrak (g)}} \times 100\% \quad \dots (9)$$

Keterangan:

w = sampel (g)

w₃ = berat kadar abu larut air (g)

3.8 **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)**

Sampel dilarutkan dengan asam format 0,1% (fase gerak dan CH₃CN), kemudian disaring melalui millex 0,22 µm. Sebanyak 5 µL sampel disuntikkan ke sistem LC-MS dengan instrumen ESI (suhu 500 °C, tegangan kapiler 3,0 kV, tegangan kelembaban 30 V), mode pemindaian penuh 50–1200 m/z, menggunakan kolom UPLC BEH C18 (1,7 µm; 2,1 × 50 mm)

KARAWANG

3.9 Analisis relavan

Hasil dari penelitian yang relevan, dapat jelaskan sebagai berikut:

Tabel 3. 1 Hasil Penelitian Relevan Yang Terkait

No	Judul Penelitian			Metode	Hasil
1.	Studi Fitokimia Ekstrak Daun Begonia terhadap Aktivitas Antioksidan			Ekstraksi etanol 70%,uji fitokimia	Ekstrak daun Begonia mengandung flavonoid, tanin, dan fenolik yang berkontribusi pada aktivitas antioksidan tinggi
2.	Standarisasi Begonia Tradisional	Simplisia sebagai	Daun Obat	Penetapan parameter spesifik & non spesifik sesuai Farmakope Herbal Indonesia	Simplisia memenuhi syarat kadar air < 10% dan memiliki kandungan flavonoid dominan

KARAWANG

3.	Profil Bioaktif Begonia	LC-MS dari Ekstrak Etanol	Senyawa Ekstraksi, LC- MS	Ditemukan senyawa Golongan flavonoid (quercetin, kaempferol) dan fenolik dengan aktivitas potensial sebagai antiinflamasi
----	-------------------------	---------------------------	---------------------------	---



KARAWANG

3.10 Diagram Alir



