

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian yang mengadopsi desain acak lengkap, agar pengaruh variasi konsentrasi ekstrak daun *Begonia heracleifolia* Schltdl. & Cham. ada aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dapat diuji. Ekstraksi dilakukan memakai tiga jenis pelarut organik dan uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran atau hole plate assay. Proses ekstraksi daun *Begonia heracleifolia* Schltdl. & Cham. dengan metode maserasi bertingkat. Proses dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 96%.

3.2 Populasi dan Sampel

Sampel tanaman yang digunakan pada analisis yaitu daun *Begonia tapak hitam*. Ekstrak daun dipilih sebagai sampel dalam penelitian ini *Begonia heracleifolia* Schltdl. & Cham. menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 96%. Sampel diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO).

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Analytical balance, wadah maserasi, aluminium foil, batang pengaduk, sendok tanduk, blender, botol tampung hasil maserasi, cawan porselen, pelat porselen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer, beaker glass, labu ukur, kaca arloji, corong gelas, pipet tetes, pipet mikro, spatula, waterbath, autoklaf, inkubator, buret, kapas, glass wolle, chamber, Botol coklat 2,5L, Botol coklat 100ml, Vial 15ml, Wadah untuk vial, Plat KLT, lampu UV. Alat pengujian antibakteri adalah laminar air flow (LAF), cawan petri, pembakar bunsen, mikropipet, tip mikropipet, L-glass, cup borer, jangka sorong, aluminium foil, inkubator, pinset, jarum

ose, pelubang sumuran 4 mm, kulkas pendingin serta Spektrofotometer UV-Vis dan spektroskopi IR.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan uji adalah daun *Begonia* hitam, bakteri *Staphylococcus aureus*, pelarut etanol, etil asetat dan n-heksana, aquadest steril, Silika gel 200g, Media Nutrient Agar (*merk*), NaCl 0,9%, etanol 96%. Bahan penapisan fitokimia adalah gelatin 1%, serbuk magnesium, NaOH, H₂SO₄. Pereaksi Meyer, HCl, FeCl₃, HNO₃ dan Pereaksi Dragendorf.. Antibiotik pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah Amoxicillin 500 mg,

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dimulai dari Januari 2025 sampai Mei 2025.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Proses determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa spesies yang digunakan dalam penelitian adalah spesies yang tepat dan tidak tertukar dengan spesies lain yang serupa. Langkah ini penting untuk mencegah kesalahan dalam interpretasi hasil penelitian. Identifikasi tanaman *Begonia heracleifolia* dilakukan di Departemen Biologi, Universitas Padjadjaran, Bandung.

3.5.2 Penyiapan Sempel

Daun segar *Begonia heracleifolia* Schltdl. & Cham. dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan penutup kain hitam selama satu hari.

Simplisia kering tersebut dihaluskan menggunakan blender untuk memperluas permukaan sehingga senyawa aktif di dalamnya dapat

diekstraksi dengan lebih optimal. Serbuk hasil penghalusan kemudian diayak untuk mendapatkan ukuran partikel yang seragam, yaitu 40 mesh. Serbuk yang telah diayak disimpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu ruang guna mencegah kontaminasi serta kerusakan senyawa aktif.

3.5.3 Ekstraksi

Perlakuan aplikasi ekstraksi diperoleh dari Abriyani, 2016. *Simplisia* yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam maserator dan kemudian pelarut n-heksana dimasukkan. Sampel direndam dan diaduk sesekali, kemudian ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan ulangi ekstraksi hingga hasil larutan ekstraksi tidak berwarna lagi. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana disatukan dan dipekatkan dengan *rotary evaporation* sampai mendapatkan ekstrak kental n-heksana. Kemudian dihitung nilai dari % rendemen ekstrak kental pelarut n-heksana.

Ampas sisa ekstraksi yang menggunakan pelarut n-heksana dikeringkan. Setelah ampas kering dan pelarut menguap, ekstraksi dilanjutkan menggunakan pelarut etil asetat dengan alur perendaman yang sama dengan perendaman pelarut sebelumnya. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat disatukan dan dipekatkan kemudian dihitung % rendemen ekstrak.

Sisa ekstraksi menggunakan etil asetat diuapkan dan menjalani proses ekstraksi memanfaatkan pelarut etanol dengan perlakuan serupa seperti ekstraksi dengan pelarut sebelumnya. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol disatukan dan dipekatkan kemudian dihitung rendemen ekstrak yang didapat. Menurut penelitian (Abriyani., 2016) setelah ekstrak kental didapatkan dihitung persen rendemen ekstrak yang didapat menggunakan rumus berikut:

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

Persen rendemen merupakan rasio berat ekstrak yang diperoleh dibandingkan dengan berat simplisia sebagai bahan baku, semakin tinggi nilai persen rendemen, semakin besar jumlah ekstrak yang diperoleh. Nilai persen rendemen yang tinggi menunjukkan kandungan komponen bioaktif yang lebih banyak dalam tumbuhan tersebut. Dengan meningkatnya persen rendemen, kandungan zat yang larut dalam ekstrak juga semakin tinggi. Perhitungan persen rendemen bertujuan untuk menentukan rasio antara berat ekstrak pekat dan berat serbuk simplisia yang diekstraksi sesuai prosedur (Falestin *et al.*, 2024). Persen rendemen dikatakan baik jika nilainya lebih dari 10% (Meianti & Manalu., 2022).

3.5.4 Skrining Fitokimia

Pada penelitian ini diaplikasikan oleh Abriyani *et al.*, 2022 & Jumadi, 2023 dilakukan pengujian skrining fitokimia senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, kuinon, saponin, fenolik, terpenoid dan steroid.

a. Alkaloid

1 gram ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 ml HCl 2N dan dikocok. Larutan yang sudah tercampur dipisahkan menjadi 2 tabung reaksi yang berbeda. Masing-masing tabung reaksi diberi 1 tetes reagen. Pada tabung reaksi yang pertama diberi reagen Dragendorff dan pada tabung reaksi kedua di beri reagen Mayer. Terbentuknya endapan merah setelah ditambahkan reagen Dragendorff dan terbentuknya endapan kuning pada penambahan reagen Mayer menunjukkan bahwa sampel positif mengandung senyawa alkaloid.

b. Flavonoid

1 gram ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga.

c. Tanin

3 gram Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 tetes larutan gelatin. Terbentuknya endapan putih menunjukkan hasil positif adanya tanin.

d. Kuinon

Ekstrak Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi NaOH. Jika terbentuk larutan berwarna kuning tua, jingga, atau merah, hal ini menunjukkan hasil positif adanya kuinon.

e. Saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan cara melarutkan sampel ke dalam aquadest, kemudian dipanaskan selama 15 menit dan dikocok selama 10–15 detik. Terbentuknya busa yang stabil sekitar 10 menit dan tidak hilang saat ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2N menunjukkan bahwa sampel positif mengandung saponin.

f. Fenolik

1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 tetes FeCl_3 5%. Hasil positif adanya senyawa fenolik adalah terbentuknya warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau

g. Terpenoid

2 gram ekstrak ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Hasil yang positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna merah atau violet.

h. Steroid

2 gram ekstrak ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Hasil yang positif menghasilkan warna hijau.

3.6 Pengujian Bioaktivitas Antibakteri

3.6.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci bersih menggunakan sabun, lalu dikeringkan. Setelah itu, alat-alat tersebut

dibungkus dengan kertas dan disterilkan bersama media Nutrient Agar (NA) menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Rikha *et al.*, 2023).

3.6.2 Pembuatan Larutan Kontrol Positif dan Negatif

DMSO (Dimetil sulfoksida) digunakan sebagai larutan kontrol negatif. Larutan kontrol positif dibuat dari sediaan antibiotik Amoxicillin yang dibuat dengan cara Amoxicillin Sebanyak 500 mg sampel dimasukkan ke dalam gelas beker berkapasitas 50 mL. Selanjutnya, ditambahkan aquadest steril hingga volume total larutan mencapai 50 mL, kemudian diaduk hingga tercampur merata.

3.6.3 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Sebanyak 10 gram media Nutrient Agar (NA) dilarutkan dalam 500 ml aquadest steril menggunakan labu Erlenmeyer. Larutan kemudian dihomogenkan dengan pemanasan menggunakan hot plate hingga mendidih. Setelah homogen, Labu Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dibungkus aluminium foil, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai dan media mendingin, aluminium foil dan kapas dilepas secara perlahan, kemudian media NA dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat (Rikha *et al.*, 2023).

3.6.4 Peremajaan Kultur Murni Bakteri Uji

Bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni masing-masing diambil menggunakan satu ose steril. Bakteri tersebut kemudian diinokulasikan dengan cara digores pada permukaan media Nutrient Agar (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rikha *et al.*, 2023).

3.6.5 Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% (b/v) sebanyak 5 ml dan dihomogenkan dengan cara dikocok. Kekeruhan

suspensi bakteri uji diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 530 nm dengan transmitan 25% (Masayu *et al.*, 2020).

3.6.6 Pengujian Antibakteri

Metode sumuran digunakan untuk menguji antibakteri. Suspensi bakteri yang telah dibuat sebelumnya disebarkan ke dalam media NA yang telah dipadatkan sebanyak 50 µl (mikroliter). Setelah itu, suspensi didiamkan selama beberapa menit agar dapat meresap ke dalam media. Kemudian, pelubang sumuran steril digunakan untuk membuat sumur di dalam media. Konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% digunakan untuk larutan ekstrak (Shobi dan Viswanathan., 2018). Larutan untuk kontrol positif dan negatif dibuat.

Setiap larutan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% dimasukkan ke dalam sumur yang telah diberi label sebelumnya. Media bakteri dan pelarut yang terkandung di dalamnya Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, zona bening di sekitar sumuran diamati dan diameter zona hambatnya pengukuran dilakukan pada arah horizontal dan vertikal dengan menggunakan jangka sorong (Shobi dan Viswanathan., 2018).

Daya hambat bakteri diukur menggunakan jangka sorong dengan rumus:

$$R\% = \frac{(Dv - Ds) + (Dh - Ds)}{2}$$

Keterangan :

R% = Daya Hambat (mm)

Dv = Diameter Vertikal (mm)

Dh = Diameter Horizontal (mm)

Ds = Diameter Sumuran (mm)

3.7 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

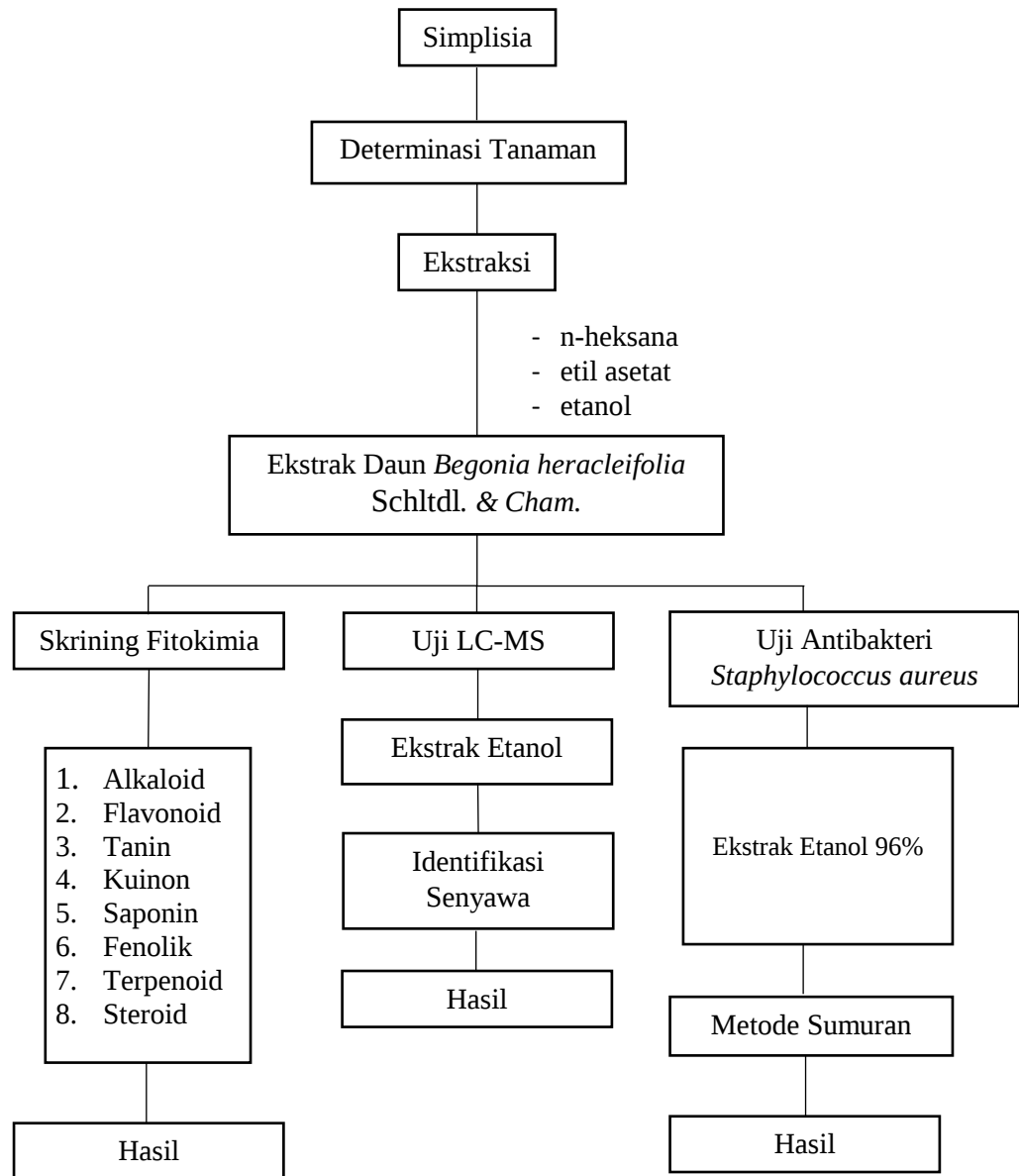
Sampel ditimbang sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam 1 mL asetonitril, kemudian dilakukan proses sonikasi selama 2 menit. Setelah

itu, larutan disaring dan diencerkan hingga mencapai konsentrasi 100 ppm untuk digunakan sebagai larutan induk. Larutan tersebut kemudian disuntikkan ke dalam instrumen LC-MS dengan laju alir fase gerak sebesar 200 $\mu\text{L}/\text{menit}$. Selanjutnya, dilakukan pengamatan dengan terhadap waktu retensi (R_t) pada kromatogram serta spektrum fragmentasi melalui data spektra dari spektroskopi massa. Instrumen yang digunakan menggunakan sistem *Electrospray Ionisation* (ESI) dengan mode ion positif, kolom C18 dengan panjang 50 mm, diameter dalam 2,1 mm, dan ukuran partikel 1,7 μm . Fase gerak yang digunakan berupa campuran asetonitril dan air dengan perbandingan 15:85 (v/v), serta kecepatan alir diatur sebesar 0,2 mL/menit (Taupik *et al.*, 2020).

3.8 Analisis

Analisis kandungan kimia pada ekstrak etanol daun *Begonia heracleifolia* Schltdl. & Cham. dilakukan dengan menggunakan instrumen *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS), yang menggabungkan teknik pemisahan senyawa melalui kromatografi cair dengan deteksi berdasarkan massa. Metode ini memungkinkan identifikasi senyawa berdasarkan massa molekul serta struktur kimia yang dideteksi. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan metode sumuran dengan mengamati diameter zona hambat sebagai indikator efektivitas antibakteri. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan metode *One Way ANOVA* (*Analysis of Variance*), yang kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut *Tukey's Multiple Comparisons Test* melalui perangkat lunak GraphPad Prism versi 10.4.0, untuk menentukan perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan.

3.9 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian