

BAB III **METODE PENELITIAN**

3.1 Metode penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan standarisasi ekstrak etil asetat dari daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq melalui metode maserasi bertingkat, pengujian standarisasi, profil fitokimia, serta analisis menggunakan LC-MS. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol 70%, masing-masing diulang sebanyak tiga kali. Uji standarisasi meliputi parameter spesifik dan nonspesifik, sedangkan uji profil fitokimia digunakan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder, termasuk alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/terpenoid, fenol, dan kuinon. Penelitian ini menggunakan pendekatan deskriptif dengan metode eksperimental yang dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang dengan mengikuti prosedur kerja yang sistematis.

Penelitian ini standarisasi ekstrak daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang untuk mengetahui standarisasi dan kandungan pada ekstrak daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq.

3.2 Pengumpulan Sample

Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah simplisia daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) yang berlokasi di kota Bogor, Provinsi Jawa Barat.

3.3 Prosedur penelitian

3.3.1 Determinasi

Determinasi tanaman bertujuan memastikan bahwa spesies yang digunakan dalam penelitian benar-benar tepat dan tidak tertukar dengan spesies lain yang mirip, sehingga dapat menghindari kesalahan dalam penafsiran hasil. Identifikasi *Begonia x erythrophylla* Hérincq pada penelitian ini dilakukan di Departemen Biologi, Universitas Padjadjaran (UNPAD), Bandung.

3.3.2 Penyiapan Sample

Pada sampel daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq dikumpulkan dan dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran, kemudian daun dikeringkan dalam suhu ruangan atau menggunakan oven pada suhu tidak lebih dari 40°C untuk mempertahankan kandungan senyawa bioaktif, setelah itu daun kering digiling menggunakan blender atau alat penghancur hingga menjadi serbuk halus, ekstrak dari pelarut yang telah di hasilkan disimpan dalam botol kaca tertutup rapat ditempat gelap dan suhu dingin untuk mencegah degradasi senyawa aktif (Gupta *et al.*, 2019).

3.3.3 Pembuatan Rendemen Etil Asetat Daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq

Pembuatan ekstrak dikerjakan dengan prosedur maserasi menggunakan pelarut etil asetat (v/v), satu banding (317 gram) serbuk simplisia dituangkan dalam saserator berupa toples kaca sertutup, ditambahkan 10 bagian pelarut (3,1 Liter), kemudian direndam pada suhu ruang selama 24 jam dan sambil sesekali di aduk, rendemen di pisahkan dengan cara di saring dengan menggunakan kertas saring dan corong, setelah di saring maserat di lanjutkan dengan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada 45°C kecepatan 228 rpm dan di uapkan hingga mengental dengan water bath dengan suhu 80°C, kemudian dihitung rendemen ekstrak yang apabila tidak langsung digunakan, ekstrak dapat disimpan pada suhu 40°C (dingin) dengan menggunakan botol kaca gelap untuk menghindari paparan cahaya (Gediz Erturk *et al.*, 2018).

Tabel 3 1 rumus rendemen ekstrak

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

3.3.4 Maserasi bertingkat

Maserasi bertingkat memungkinkan proses ekstraksi senyawa secara selektif sesuai dengan jenis pelarut yang digunakan, di mana pemilihan pelarut menjadi sangat penting karena polaritasnya memengaruhi jenis senyawa aktif yang dapat terekstraksi, pelarut polar cenderung melarutkan senyawa polar, pelarut nonpolar mengekstraksi senyawa nonpolar, sedangkan pelarut semipolar mengekstraksi senyawa semipolar, secara umum tumbuhan menghasilkan dua kelompok utama senyawa fitokimia yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder, metabolit primer berperan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan dasar tanaman yang meliputi asam nukleat, karbohidrat, asam lemak, dan protein esensial, sedangkan metabolit sekunder berfungsi meningkatkan kemampuan adaptasi tanaman terhadap lingkungan serta memberikan perlindungan dari berbagai ancaman, pada penelitian ini ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi bertingkat dengan sampel berupa 500 gram simplisia daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq yang dimasukkan ke dalam toples, kemudian ditambahkan 5 liter pelarut n-heksana dan dimaserasi pada suhu kamar di tempat gelap selama 24 jam dengan pengadukan hingga larut, selanjutnya larutan disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang diperoleh diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40 °C (Hamka *et al.*, 2022).

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat yang di gunakan dalam penelitian ini yaitu:

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Beaker glass* (berbagai ukuran: 50 mL, 100 mL, 250 mL), 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, ayakan mesh 40, corong, loyang, tabung reaksi, rak tabung reaksi, krus 30 mL.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi simplisia daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq yang telah dikeringkan dan dihaluskan, pelarut n-heksan, etil asetat, etanol 70%, dan aquadest. Selain itu digunakan juga pereaksi kimia seperti Mayer, Dragendorff, Mg, HCl 2N, amil alkohol, asam klorida 2M, FeCl₃, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, CHCl₃, vanilin sulfat 10%, Lieberman-Burchard, serta alat bantu seperti kertas saring dan aluminium foil.

3.5 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari April hingga Juli 2025, dengan kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Universitas Buana Perjuangan Karawang, dan Universitas Padjadjaran, Bandung.

3.6 Variabel Penelitian

1. Klasifikasi variabel

a. Variabel bebas

Pelarut yang digunakan dalam maserasi bertingkat (n-heksan, etil asetat, dan etanol 70%), metode analisis yang diterapkan (skrining fitokimia dan LC-MS).

b. Variabel terkait

Profil fitokimia ekstrak daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq menunjukkan adanya kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan senyawa lainnya, sedangkan hasil parameter standarisasi meliputi kadar air, kadar abu, serta kadar sari larut dalam pelarut tertentu.

3.7 Penapisan Fitokimia

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

a. Alkaloid

Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 ml HCl 2N dan dikocok hingga homogeny, larutan tersebut

dibagi ke dalam dua tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendorff, sedangkan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer, Hasil positif untuk alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah pada tabung yang diberi Dragendorff dan endapan kuning pada tabung yang diberi Mayer.

b. Flavonoid

Sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat, keberadaan flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi hitam kemerahan, kuning, atau jingga.

c. Tanin

Sejumlah ekstrak ditambahkan 5 mL etanol, kemudian 2–3 tetes larutan FeCl_3 1% ditambahkan, hasil positif ditunjukkan dengan munculnya warna hitam kebiruan atau hijau kehitaman.

d. Kuinon

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan pereaksi NaOH, jika terbentuk larutan warna kuning tua, jingga atau merah maka positif mengandung kuinon.

e. Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan sampel dalam aquadest, dipanaskan selama 15 menit, dan dikocok selama 10–15 detik, terbentuknya busa stabil yang bertahan sekitar 10 menit dan tidak hilang setelah penambahan beberapa tetes HCl 2N menunjukkan bahwa sampel positif mengandung saponin.

f. Fenolik

1 gram ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi, lau ditambah 10 tetes FeCl_3 5%, hasil positif adanya senyawa fenolik adalah warna merah, biru, ungu, hitam atau hijau

g. Terpenoid

2 gram ekstrak ditambahkan dengan pereaksi libermann-burchard, hasil yang positif ditandai dengan terjadinya perububahan warna merah atau violet.

h. Streoid

2 gram ekstrak ditambahkan dengan pereaksi libermann-burchard, hasil yang positif menghasilkan warna hijau.

3.8 Penentuan Parameter-Parameter Standarisasi

3.8.1 Uji Prameter Spesifik

1. Identifikasi (Determinasi)

Determinasi merupakan proses membandingkan suatu tumbuhan dengan tumbuhan lain yang sudah teridentifikasi sebelumnya untuk memastikan kesesuaian spesiesnya, alat utama dalam proses ini adalah kunci determinasi, yaitu panduan yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu spesies berdasarkan ciri-ciri spesifik yang tidak dimiliki oleh tumbuhan lain (Izza *et al.*, 2018), kunci determinasi tersusun atas serangkaian pernyataan sistematis yang dirancang untuk membantu proses identifikasi makhluk hidup. Setiap pernyataan disajikan dalam bentuk dua alternatif jawaban, di mana masing-masing jawaban akan mengarahkan pada pernyataan berikutnya hingga diperoleh satu kesimpulan identitas spesies yang dimaksud (Fajri *et al.*, 2019).

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 x erythrophylla* Hérincq dilakukan di Departemen Biologi, Universitas Padjadjaran, Bandung.

2. Organoleptik

Uji organoleptik dari ekstrak meliputi bentuk, bau, warna dan tekstur dari tanaman *Begonia x erythrophylla* Hérincq.

3. Kadar sari larut dalam air

Timbang 2 gram ekstrak, kemudian dimeserasi dengan air-kloroform selama 24 jam dalam labu erlenmeyer 100ml, sesekali

dikocok selama 6 jam pertama didiamkan 18 jam, saring cepat, ambil filtratnya sebanyak 20 ml, uapkan 20 ml filtrat dalam cawan dangkal (yang telah ditara) diatas tengkas air hinngga kering/waterbath, lalu panaskan residu pada oven dengan suhu 105°C hingga bobot tetap (Rosidah *et al.*, 2020).

Rumus :

$$\frac{w_1 - w^\circ}{\text{bobot simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100$$

Keterangan :

w° = bobot cawan kosong

w_1 = bobot cawan + residu

4. Senyawa larut dalam etanol

Sebanyak 2 gram ekstrak ditimbang lalu dimaserasi menggunakan etanol 96% dalam labu Erlenmeyer 100 mL selama 24 jam, dengan pengocokan sesekali pada 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam berikutnya, setelah itu larutan segera disaring untuk mencegah penguapan etanol dan diambil 20 mL filtrat, kemudian filtrat diencerkan dengan air hingga kering dan residunya dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C sampai mencapai bobot tetap (Rosidah *et al.*, 2020).

Rumus :

$$\frac{w_1 - w^\circ}{\text{bobot simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100$$

Keterangan :

w° = bobot cawan kosong

w_1 = bobot cawan + residu

3.8.2 Uji Parameter Non Spesifik

1. Susut pengeringan

1 g ekstrak ditimbang dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan ditimbang, ratakan dengan menggoyangkan hingga merupakan lapisan setebal (5-10mm) 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 tetap, 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 (Sutomo *et al.*, 2021).

Persentase susut pengeringan dihitung dengan rumus:

$$\text{susut pengeringan} = \frac{A - B}{B} \times 100\%$$

A=berat (g) sampel sebelum dipanaskan

B= berat (g) akhir

2. Bobot jenis

Piknometer kosong berukuran 25 mL terlebih dahulu ditimbang, kemudian diisi penuh dengan air dan ditimbang kembali untuk menentukan kerapatan air. Setelah itu, piknometer dikosongkan dan diisi penuh dengan ekstrak yang telah diencerkan dengan air, lalu ditimbang pada suhu 25°C, dengan cara ini, kerapatan ekstrak dapat ditentukan (Suhendy *et al.*, 2022).

Rumus :

$$B_j = \frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1}$$

Keterangan:

W1 : Bobot Piknometer + Ekstrak Cair (g)

W3 : Bobot Piknometer + Kosong (g)

W2 : Bobot Piknometer + Aquades (g)

3. Kadar air

Ditimbang 1 gram ekstrak ke dalam cawan penguap yang sudah ditarat, kemudian dikeringkan di oven dengan suhu 105°C dalam waktu 1 jam lalu didinginkan menggunakan desikator selama 30 menit dan ditimbang, setelah itu dilakukan pengeringan kembali dalam jarak 3 jam dan 1 jam dan ditimbang, yang dimana 3 wadah penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Sutomo *et al.*, 2021).

Rumus :

$$\text{Kadar air} = \frac{w_1 - w_0}{w_3 - w_0} \times 100\%$$

Keterangan :

w_0 : bobot cawan kosong

w_1 : bobot cawan + sample

w_3 : bobot setelah dipanaskan

4. Kadar abu

Sebanyak 2 gram ekstrak yang telah digerus ditimbang dengan seksama, kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat atau krus platina yang telah dipijarkan, setelah itu dipanaskan di atas hot plate hingga menjadi arang. Serbuk kemudian diratakan dan krus dipijarkan secara bertahap pada suhu 500–600°C dalam tanur (furnace) hingga arang habis atau hanya tersisa abu. Selanjutnya, krus didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang hingga mencapai bobot tetap (Rosidah *et al.*, 2020).

Rumus:

$$\% \text{ kadar abu total} = \frac{(\text{Bobot krus} + \text{abu}) - (\text{Bobot krus kosong})}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

5. Kadar Abu Tidak Larut Dalam Asam

Abu dari penetapan kadar abu total direbus dengan 25 mL asam klorida pekat selama 5 menit, kemudian bagian yang tidak larut asam dipisahkan dengan cara penyaringan menggunakan krus kaca sinter atau kertas saring

bebas abu, setelah itu residu dicuci dengan air panas, dipijarkan di atas hot plate selama 15 menit, dan dilanjutkan dengan pemijaran dalam tanur pada suhu $\pm 450^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh bobot tetap (Rosidah *et al.*, 2020).

$$\text{kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{bobot abu tidak larut asam}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100\%$$

3.9 Metode LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

Karakterisasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat daun *Begonia x erythrophylla* Hérincq menggunakan teknik LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) dilakukan di Universitas Airlangga, Proses diawali dengan preparasi sampel, yaitu mengeringkan dan menimbang 0,0010 g sampel menggunakan tabung Eppendorf, Sampel kemudian dilarutkan dalam asetonitril dengan konsentrasi 100 ppm dan dicampur hingga homogen menggunakan vortex. Selanjutnya, larutan dimasukkan ke dalam vial untuk dianalisis menggunakan instrumen Agilent 6530 QTOF LC/MS (santos *et al.*, 2020).

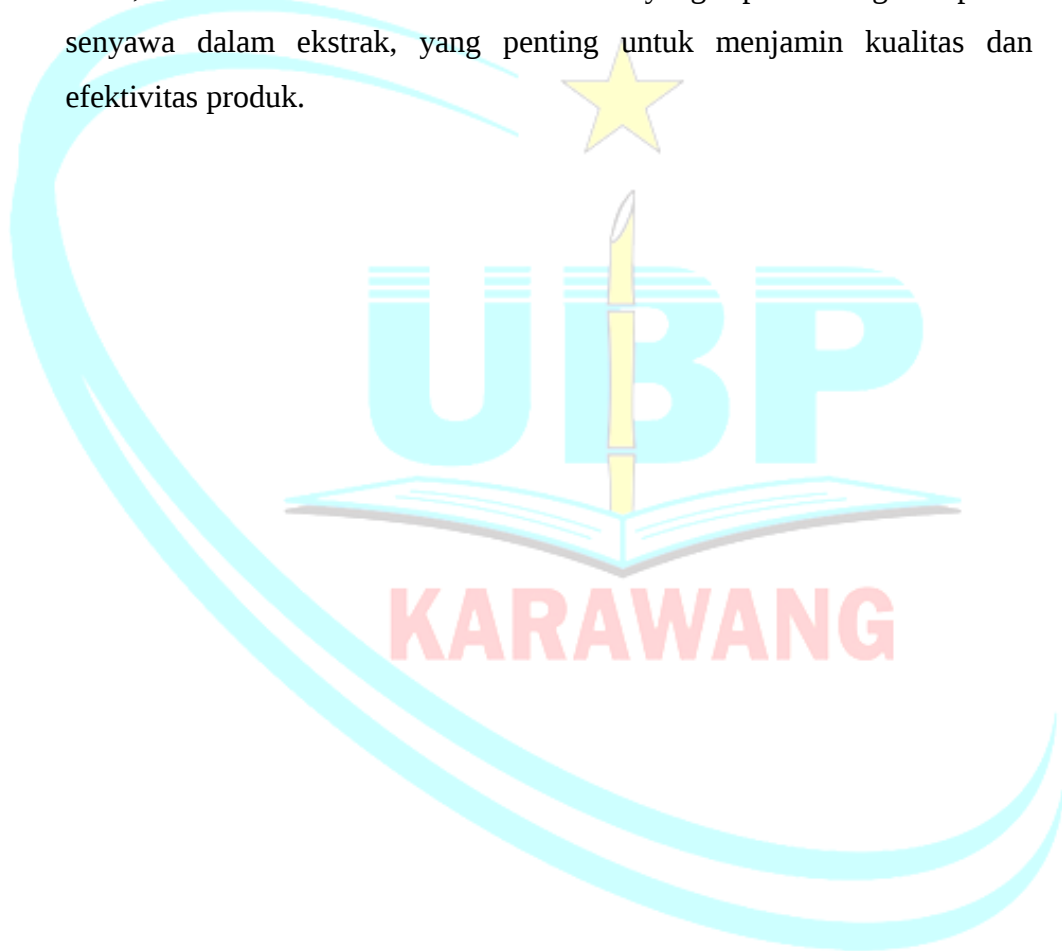
Analisis dilakukan menggunakan sistem LC yang dilengkapi dengan pompa biner dan terintegrasi dengan spektrometer massa tipe *Quadrupole Time of Flight* (QTOF), yang menggunakan sumber ionisasi *Electrospray Ionization* (ESI), spektrometri massa dijalankan dalam mode ionisasi positif. Parameter ESI yang diterapkan meliputi aliran gas pengering sebesar 8 L/menit dengan suhu 300°C , serta *collision energy* sebesar 0 Ev, Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan kolom Poroshell 120 EC-C18 berukuran $3,0 \times 50$ mm dengan ukuran partikel $2,7 \mu\text{m}$ dan laju alir $0,4 \text{ mL/menit}$. Fase geraknya berupa campuran asetonitril (ACN) dan air yang mengandung 0,1% asam format, dengan program gradien sebagai berikut: menit ke-0 (10:90), menit ke-2 (90:10), menit ke-8 (70:30), menit ke-12 (50:50), menit ke-15 (80:20), dan menit ke-17-20 (95:5), Total waktu analisis mencapai 20 menit. Hasil identifikasi menunjukkan semua jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Begonia x erythrophylla* Hérincq (Kaliawan dan Danardono, 2023).

3.10 Analisis

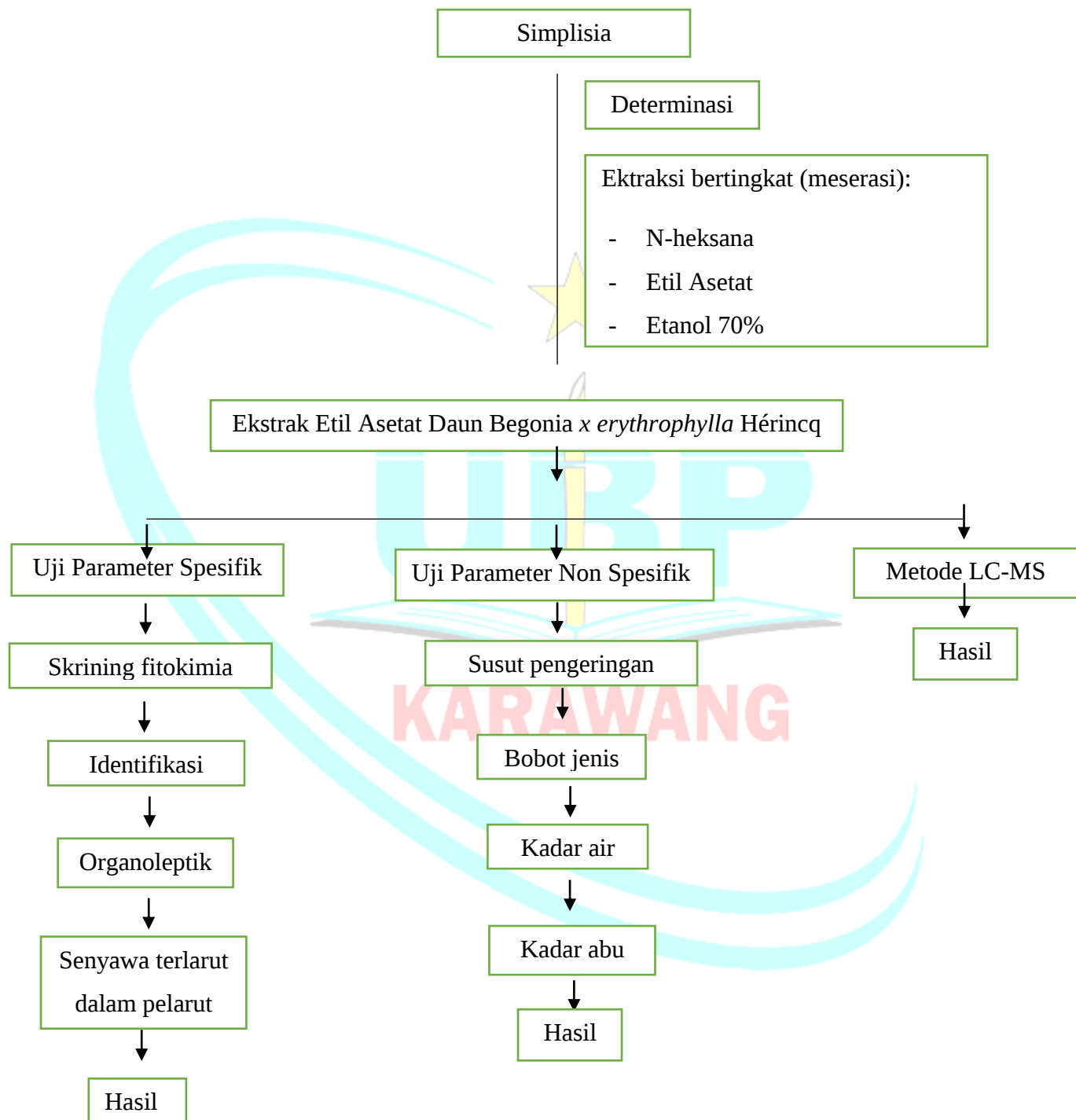
Analisis kandungan kimia pada ekstrak etanol daun *Begonia x*

erythrophylla Hérincq, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, dilakukan dengan menggunakan instrumen *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

Mencocokkan kembali data dari hasil LC-MS dengan mengecek kembali informasi kimia dalam standarisasi ekstrak herba dengan menggunakan *pub chem*, karena analisis ini memberikan data yang tepat tentang komposisi senyawa dalam ekstrak, yang penting untuk menjamin kualitas dan efektivitas produk.



3.11 Diagram alir penelitian



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian