

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian mengenai standarisasi pelarut n-heksana pada Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq dengan ekstraksi maserasi bertingkat, standarisasi, profil fitokimia dan metode GC-MS. Proses ekstraksi daun *Begonia* dengan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut Bertingkat. proses dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol 70%. Pada Pengujian standarisasi dengan menguji Parameter Spesik dan non spesifik. Dan pada Pengujian profil fitokimia dengan menguji senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid/terpenoid, fenol, kuinon. Penelitian ini digunakan dengan metode eksperimental yang dilakukan di laboratorium Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang. Tahapan- tahapan tersebut dilakukan dengan prosedur kerja sebagai berikut.

3.2 Pengumpulan Sampel

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

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian yaitu alat-alat gelas (Pirex), Blender, Cawan Porselen, Waterbath (Memmert WNB 22), Rotary evaporator (Buchi R-300), Timbangan analitik (Mettler Toledo XS204), Gelas Ukur, Pipet Tetes, Oven (Memmert UN30), Loyang, Ayakan ukuran 40mesh, Maserator, Krus, Tabung reaksi, rak tabung dan *Gas Chromatography* - Spektrometri Massa (GC-MS).

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dipakai selama penelitian yakni simplisia Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq yang sudah kering dan dihaluskan, pelarut n-heksana, etil asetat, etanol 70%, aquadest, pelarut Dragendrof, Mayer, serbuk Mg, FeCl₃, Kloroform, Amil Alkohol. Asam Asetat Anhidrat, KOH 5%, HCL 2N, Amonia, Etanol P.a, Lieberman Buchard, Vanilin 10% dalam Asam Sulfat, Gelatin 1%, Kertas Saring, Alumunium foil, Methanol, Gas Helium.

3.4 Waktu dan tempat pelaksana

Penelitian ini dilaksanakan dibulan Januari 2025 hingga bulan Mei 2025 yang dilakukaannya penelitian yaitu di laboratorium Bahan Alam Universitas Buana perjuangan Karawang dan Universita Pajajaran Bandung.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Tanaman *Begonia x erythrophylla* Herincq

Begonia x erythrophylla Herincq yang digunakan dalam hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan bahwa tumbuhan yang dipakai untuk menjamin standarisasi parameter spesifik dan non spesifik pada simplisia *Begonia x erythrophylla* Herincq.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian dengan parameter spesifik dan non spesifik. Pengujian dengan parameter spesifik meliputi identitas simplisia, uji organoleptik, dan pengujian kadar sari, uji skrining fitokimia, sedangkan parameter non spesifik meliputi susut pengeringan, bobot jenis, kadar air, dan kadar abu tidak larut dalam asam.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi

Determinasi atau Identifikasi pada tanaman *Begonia x erythrophylla* Herincq dilakukan di Universitas Pajajaran (UNPAD) laboratorium Biosistemika, Departemen Biologi FMIPA Bandung bertujuan untuk mendapatkan jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas agar tidak terjadi kesalahan pada pengambilan bahan baku.

3.6.2 Penyiapan Sampel

Pada sampel Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq segar 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 (Prasad *et al.*, 2021). Setelah itu Daun kering digiling menggunakan blender atau alat penghancur hingga menjadi serbuk halus (Sigh *et al.*, 2019). Ekstrak dari masing-masing pelarut disimpan dalam botol kaca tertutup rapat ditempat gelap dan suhu dingin untuk mencegah degradasi senyawa aktif (Gupta *et al.*, 2019).

3.6.3 Ekstraksi Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Timbang 300 gram Simplisia Daun *Begonia x erythrophylla* Herincq kedalam toples, tambahkan 3 L larutan n-heksana. Dilakukan penyimpanan pada tempat yang gelap dan dihindari langsung oleh matahari pada suhu kamar. Biarkan selama 1 x24 jam, aduk terus atau sampai larut., keluarkan, tiriskan, saring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh di rotary Evaporator pada suhu 40°C dan lakukan kurang lebih 3 kali proses remaserasi pada sampel yang sama (Depkes RI, 2000).

3.7 Penapisan Fitokimia

1. Uji 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.

2. Uji 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. Uji Saponin

Langkah-langkah dilakukan dengan mengkocok 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.

4. Uji Tanin

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

5. Uji Steroid – Triterpenoid

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 memberikan tanda bahwa sampel positif memiliki Triterpenoid.

6. Monoterpenoid

Dilarutkan Sedikit Ekstrak dengan Eter kemudian larutan ekstrak ditempatkan di Pelat Tetes dan dibiarkan sampai kering. Selanjutnya, ditetaskan larutan Vanillin 10% dalam Asam Sulfat (Vanillin Sulfat). Terbentuknya warna- warna membuktikan adanya Monoterpen maupun Seskuiteren (Pandami E, Ngginak., 2020).

7. 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).

8. Polifenol

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).

3.8 Penentuan Parameter-Parameter Spesifik

3.8.1 Parameter Spesifik

1. Identitas (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 *Begonia x erythrophylla* Herincq dilakukan secara visual untuk mengetahui mengenai bentuk, warna, dan bau dari ekstrak *Begonia x erythrophylla* Herincq. (Depkes,2000).

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 25ml, uapkan 25,0 ml filtrat dalam cawan dangkal (yang telah ditara) di atas tengkas air hingga kering/waterbath, lalu panaskan residu pada oven dengan suhu 105°C hingga bobot tetap.

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

Keterangan;

w_o = bobot cawan kosong

w_1 = bobot cawan + residu

4. Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Timbang 2g ekstrak, kemudian dimeserasi selama 24 jam etanol (96%) dalam labu erlenmeyer 100ml, sesekali dikocok selama 6 jam pertama, didiamkan 18 jam, saring cepat (mencegah etanol menguap) ambil filtratnya sebanyak 25ml. air hingga kering, lalu panaskan residu pada oven dengan suhu 105°C hingga bobot tetap.

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

Keterangan;

w_0 = bobot cawan kosong

w_1 = bobot cawan + residu

3.8.2 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.

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

Keterangan:

b = berat sampel (gram)

c = berat cawan + sampel

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

2. Bobot jenis

Menimbang piknometer kosong ukuran 25 mL, kemudian piknometer diisi penuh dengan ditimbang ditetapkan ulang air kerapatan Kemudian dan dapat air. piknometer kosong diisi penuh dengan ekstrak yang telah diencerkan sebanyak 5% dengan air, lalu ditimbang dengan ekstrak berat yang mempunyai volume 25 ml pada suhu 250 C, Sehingga dapat ditetapkan kerapatan ekstrak (Depkes RI,2000).

Rumus:

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

Keterangan:

W1 : Bobot Piknometer + Ekstrak Cair (g)

W3 : Bobot Piknometer + Kosong (g)

W2 : Bobot Piknometer + Aquades (g)

3. Kadar abu

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 10 menit dan timbang hingga bobot tetap.

$$\frac{w_1 - w_2}{w} \times 100\%$$

Keterangan:

w_1 = bobot krus + ekstrak setelah dipemijaran (g)

w_2 = bobot krus kosong (g)

w = bobot sampel awal (g)

4. Kadar Abu Tidak Larut Dalam Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25ml asam klorida perkat selama 5 menit, lalu dikumpulkan bagian yang tidak larut asam, saring melalui krus kaca mesir atau kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijar pada hot plate selama 15 menit, kemudian pemijaran dilanjutkan pada tanur dengan suhu kurang lebih 450°C hingga bobot tetap.

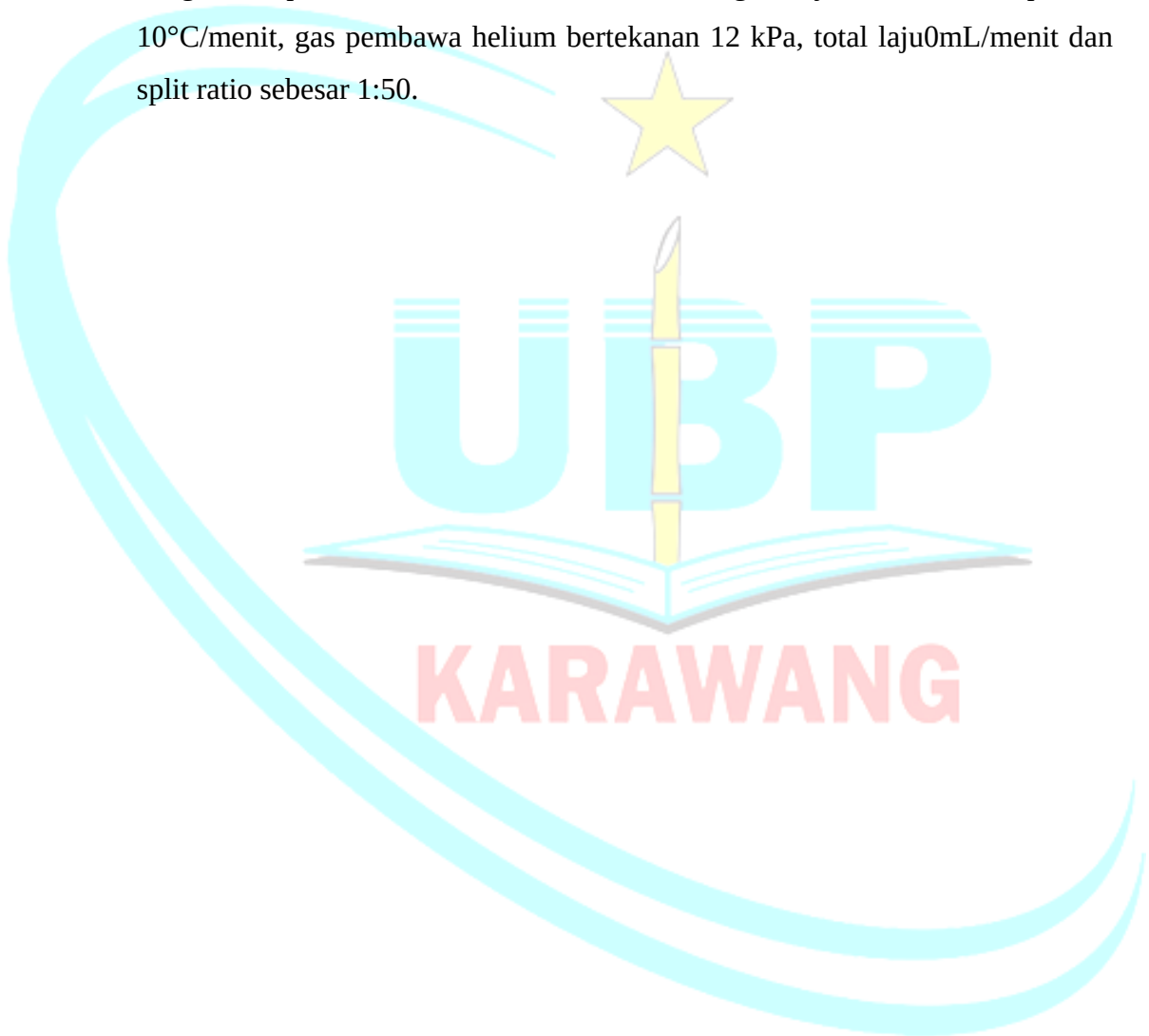
$$\frac{\text{Berat abu tidak larut asam}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3.9 Metode GC-MS

GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) merupakan instrument gabungan dari alat GC dan MS. Hal ini berarti sampel yang hendak di periksa di identifikasi dahulu dengan alat GC (*Gas Chromatography*), kemudian di identifikasi dengan alat MS (*Massa Spectrometry*) GC dan MS digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi semua komponen campuran yang mudah menguap pada kondisi Vacuum Tinggi dan Tekanan Rendah jika di panaskan. Sedangkan Spektrometri Massa untuk menentukan Bobot Molekul, Rumus Molekul, dan Menghasilkan Molekul Bermuatan (Darmapatni *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian (Sathishkumar *et al.*, 2021), data yang diperoleh melalui GC-MS senyawa tersebut memberikan rumus molekul $C_{18}H_{38}$ dengan berat molekul 254 dan $C_{20}H_{42}$ dengan berat molekul 282. Mereka menunjukkan bahwa senyawa tersebut untuk sementara identifikasi sebagai N-oktadekana

(diterpen) dan N-eikosan masing-masing. Fraksi aktif antioksidan tanaman Begonia dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS) Shimadzu QP 5000. Cara kerjanya adalah siapkan Sampel sebanyak 1 μ L di injeksikan ke GC-MS yang dioperasikan menggunakan kolom kaca panjang 25m, diameter 0,25mm dan ketebalan 0,25 μ m dengan fase diam Cp-Sil 5CB dengan temperature oven antara 70-270°C dengan laju kenaikan temperatur 10°C/menit, gas pembawa helium bertekanan 12 kPa, total laju 0mL/menit dan split ratio sebesar 1:50.



3.10 Diagram Alir Penelitian

