

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam karakterisasi metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea*) yaitu penelitian praeksperimental. Pengujian yang dilakukan terhadap sampel yaitu, penentuan susut pengeringan, ekstraksi, skrining fitokimia, fraksinasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Kolom, Kromatografi Lapis Tipis 2 Dimensi, Kromatografi Lapis Tipis Preparatif, Uji Kemurnian, dan Karakterisasi/Isolasi.

#### **3.2 Sampel**

Sampel yang digunakan yaitu simplisia batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea*) yang didapat dari hasil ekstraksi yang dilakukan di Balai Penelitian Tumbuhan Rempah dan Obat (BALITTRO) yang beralamat di Jl. Tentara Pelajar No.3 Bogor, Jawa Barat.

#### **3.3 Bahan dan Alat**

##### **3.3.1. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.), pelarut etil asetat (Brataco), pelarut etanol 96% (Brataco) pelarut n-heksan (Brataco), silica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck), silica gel 60 (0,063-0,200mm) (Merck), CHCl<sub>3</sub> pa, HCl 2N, aquadest (brataco), pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi

liberman buchard, gelatin,  $\text{FeCl}_3$  1%, Natrium Hidroksida (NaOH) 10%, Amonia, KOH, pereaksi Sitroborat, Methanol Pa (Merck), Serbuk Magnesium (Merck), Amil alkohol (1-Pentanol) (Merck).

### 3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat soxhlet (duran), *vacum rotary evaporator* (eyela osb-2100) (kapasitas 1 liter), timbangan analitik digital (shimadzu) kapasitas minimal 160 mg maksimum 220 g, meting point m3000 (kruss), penjepit tabung reaksi, oven (gemmyco yco-no1), tabung kolom kromatografi, plat klt (tlc silica gel 60 F<sub>254</sub> merck 1.05554.0001), plat tetes, pipet tetes, pipet volume (pyrex), cawan penguap, statif, klem, kertas saring (whatman), corong (pyrex), kertas perkamen, kuvet (thermo scientific), pipa kapiler, pipa kapiler melting point, alumunium foil (klinpak), kaca arloji, mortir, stamfer, lampu uv (254-366 nm) sebagai penampak noda (hikari), rak dan tabung reaksi (iwaki) kapasitas 10ml, spektrofotometer uv-vis (thermo scientific), gelas kimia (pyrex), spatula, batang pengaduk, sendok tanduk, kapas (onemed), gelas ukur (pyrex), grinder (spice herb grinder ic-10b), kompor listrik (maspion), *chamber* (duran), plat klt kaca (duran), botol vial 20ml dan botol coklat 100ml, *fourier transmitter infra red* (thermo scientific nicoleet iS-10).

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini yaitu ekstrak etil asetat batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea*) fraksi dan sub fraksi.

#### 3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini berupa penentuan susut pengeringan, ekstraksi, skrining fitokimia, fraksinasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kromatografi kolom, uji kemurnian, karakterisasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat batang kangkung pagar menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer IR.

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

Pada Tabel 3.1 definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini yaitu :

**Tabel 3.1** Definisi Operasional Variabel

| No                    | Variabel  | Definisi             | Alat Ukur          | Skala   | Hasil Ukur  |
|-----------------------|-----------|----------------------|--------------------|---------|---|
| <b>Variabel Bebas</b> |           |                      |                    |         |   |
| 1                     | Fraksi    | Fraksi diperoleh     | Kromatografi kolom | Nominal | 1. n-heksana<br>2. n-heksana<br>: etil asetat<br>3. Etil asetat |
| 2                     | Subfraksi | Sub fraksi diperoleh | Kromatografi kolom | Nominal | 1. n-heksana<br>2. n-heksana<br>: etil asetat                   |

|                         |                                     |  |   |         |                          |
|-------------------------|-------------------------------------|--|---|---------|--------------------------|
|                         |                                     | dari fraksinasi 2  |   |         | 3. Etil asetat           |
| <b>Variabel Terikat</b> |                                     |  |   |         |                          |
| 1.                      | Rendemen ekstrak                    | Perbandingan berat n-heksana ekstrak dan berat simplisia | Cawan dan timbangan analitik                            | Rasio   | % (persen)               |
| 2.                      | Skrining fitokimia                  | Mengidentifikasi kandungan senyawa x dalam sampel        | Preaksi   | Nominal | 1. Positif<br>2. Negatif |
| 3.                      | Kromatografi kolom                  | Fraksinasi   | Konsentrasi eluen, ekstrak kental, silika gel, lampu UV | Rasio   | Nilai R <sub>f</sub>     |
| 4.                      | Kromatografi lapis tipis preparatif | Pemurnian  | Kertas saring, subfraksi, silika gel,                   | Rasio   | Isolat                   |
| 5.                      | Kromatografi lapis tipis 2 dimensi  | Karakterisasi  | Isolat, silika gel, lampu UV                            | Rasio   | Isolat                   |
| 6.                      | Penentuan titik leleh               | Uji titik leleh  | Isolat, <i>Melting-Temp Electrothermal</i>              | Rasio   | Suhu °C                  |

|    |                          |              |                          |       |  |
|----|--------------------------|--------------|--------------------------|-------|--|
| 7. | Spektrofotome ter UV-Vis | Identifikasi | Spektrofotome ter UV-Vis | Rasio | Panjang gelombang (nm)                 |
| 8. | Spektrofotome ter IR     | Identifikasi | Spektrofotome ter UV-Vis | Rasio | Bilangan gelombang (cm <sup>-1</sup> ) |

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Persiapan Sampel

Tanaman kangkung pagar di determinasi terlebih dahulu di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica untuk mengetahui jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas. Sebanyak 1 kg batang kangkung pagar dibersihkan dari pengotor dengan cara di cuci di bawah air mengalir hingga bersih, di tiriskan, ditimbang berat basah, disortasi basah, dikeringkan dalam rak pengering hingga menjadi simplisia, sampel dianggap kering apabila sudah rapuh, disortasi kering, ditimbang berat kering, kemudian simplisia dihaluskan atau dijadikan serbuk menggunakan alat penggiling dan ditimbang. Selanjutnya disimpan dalam wadah bersih yang tertutup rapat dan diletakkan di tempat yang sejuk.

#### 3.6.2 Penentuan Susut Pengerinan

Penentuan susut pengerinan menggunakan metode gravimetri. Cawan porselen dikeringkan didalam oven selama 30 menit kemudian didinginkan didalam desikator selama 15 menit, lalu cawan porselen ditimbang. Sebanyak 5 g sampel ditimbang lalu dimasukkan kedalam

oven dengan suhu 105-110°C selama 3 jam lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Kemudian hasilnya ditimbang sebagai hasil penimbangan pertama. Lalu cawan yang berisi sampel dikeringkan kembali selama 30 menit, setelah itu dinginkan dalam desikator selama 5 menit kemudian ditimbang. Hasil penimbangan kedua dibandingkan dengan hasil penimbangan pertama. Bila penimbangan kedua mencapai pengurangan bobot tidak lebih dari 0,001 gram dari penimbangan pertama maka dianggap konstan. Tetapi bila tidak, maka dilakukan penimbangan kembali hingga diperoleh pengurangan bobot dua penimbangan berturut (Sudarmadji, 1997).

Untuk perhitungan susut pengeringan dengan rumus :

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{\text{Berat sampel basah (g)} - \text{Berat sampel kering (g)}}{\text{Berat sampel basah (g)}} \times 100\%$$

### 3.6.3 Ekstraksi

Ekstraksi batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) dilakukan dengan metode soxhlet. Disiapkan seperangkat alat soxhlet yang akan digunakan, lalu tabung simplisia dilapisi dengan kertas saring untuk tempat menaruh simplisia sebanyak beberapa gram. Kemudian pelarut pengestraksi dituangkan ke dalam labu alas bulat sampai kurang lebih setengah sampai dua pertiga bagian volume labu dan ditambahkan batu didih. Selanjutnya beberapa gram simplisia di basahi dengan pelarut sama banyak dengan simplisia yang digunakan banyak simplisia banding

banyak pelarut untuk membasahi simplisia (1:1) disesuaikan dengan kapasitas alat soxhlet.

Setelah itu alat soxhlet dan penangas di pasang dan *heating mantle* dinyalakan sampai suhu mencapai titik didih pelarut. Pelarut akan mendidih, menguap, mengembun pada waktu melalui kondensor, menetes melalui simplisia dan menarik komponen simplisia. Tetesan pelarut yang berisi komponen yang terekstraksi jatuh ke dalam labu. Ekstraksi dilakukan sampai diperoleh ekstrak tidak berwarna. Ekstrak cair yang diperoleh disatukan dan dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak kental. Setelah ekstrak di dapat selanjutnya dihitung rendemen ekstrak untuk menentukan perbandingan ekstrak yang diperoleh terhadap berat awal bahan simplisia. (Wang, 2021)

Rendemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak total}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

### 3.6.4 Skrining Fitokimia

#### a. Uji Kandungan Alkaloid

Serbuk simplisia sebanyak 1 gram dibasakan dengan amonia, digerus menggunakan mortar kemudian tambahkan 20 mL amonia encer 25% (NH<sub>4</sub>OH), dan tambahkan 20 ml kloroform (CHCl<sub>3</sub>), gerus kuat. Setelah itu lapisan (CHCl<sub>3</sub>) dipipet sambil disaring menggunakan pipet yang disumbat dengan kapas/disaring dengan kertas saring, kemudian lapisan (CHCl<sub>3</sub>) masukkan ke dalam

tabung reaksi. Tambahkan kedalamnya HCl 2% (1:10). Kocok kuat hingga terbentuk dua lapisan. Kemudian lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian:

Filtrat 1 : Ditambahkan pereaksi Mayer, terjadinya kekeruhan atau endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

Filtrat 2 : Ditambahkan pereaksi Dragendorff, terjadinya endapan jingga coklat menunjukkan adanya alkaloid.

Filtrat 3: Digunakan sebagai blanko.

(Fikayuniar, 2020; Harbone, 1987).

b. Uji Kandungan Saponin

Tambahkan 1-2 gram serbuk simplisia dalam tabung reaksi didihkan dalam 50 mL air selama 15 menit, kemudian dinginkan dan disaring membentuk (Filtrat A). Sejumlah Filtrat A dikocok vertical dalam tabung reaksi selama 10-30 detik. Terbentuknya busa yang persisten  $\geq 1$  cm pada penambahan 1 tetes asam klorida (HCl) 2% atau pada pendiaman selama kurang lebih 10 menit, menunjukkan adanya golongan saponin (Fikayuniar, 2020).

c. Uji Kandungan Flavonoid

Serbuk simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan 30 mL air panas, didihkan selama 5 menit, lalu disaring dengan kertas saring hingga didapatkan residu dan filtrat. 5 ml Filtrat yang dihasilkan ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 5 mL HCl 2N. Kemudian tambahkan amil alkohol, lalu kocok kuatkuat dan biarkan hingga

memisah. Terbentuknya warna kuning hingga merah (atau suatu warna ekstrak tertentu) yang dapat ditarik dengan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Fikayuniar, 2020; Harbone, 1987).

d. Uji Kandungan Tanin

Tambahkan larutan gelatin 1% kedalam Filtrat A, terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya tanin. (Fikayuniar, 2020).

e. Uji Kandungan Steroid dan Terpenoid

Filtrat B Teteskan 2 hingga 3 tetes kedalam residu pereaksi Libermann Buchard. Terbentuk warna ungu berubah jadi warna biru menunjukkan adanya golongan terpenoid, sedangkan terbentuknya warna merah berubah menjadi warna hijau menunjukkan adanya golongan steroid. (Fikayuniar, 2020).

f. Uji Polifenolat

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest panas, kemudian disaring dan filtrat ditambahkan 1%  $\text{FeCl}_3$ , jika ekstrak positif termasuk polifenolat maka akan berubah menjadi biru kehitaman. (Fikayuniar, 2020; Harbone, 1987).

### 3.6.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Disiapkan plat silika gel dengan ukuran lebar 1 cm dan panjang 5 cm lalu diberi garis batas awal 1 cm dan batas akhir elusi 0,5 cm, kemudian ekstrak cair ditotolkan pada garis awal dengan menggunakan pipa kapiler dan dibiarkan beberapa saat hingga pelarutnya menguap. Selanjutnya

pelat silika gel GF<sub>254</sub> yang telah ditotolkan sampel dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan cairan pengembang. Proses kromatografi dihentikan sampai cairan pengembang sampai ke garis depan. Setelah itu, diamati pola kromatogram dibawah lampu UV  $\lambda$ 254 dan  $\lambda$ 366 nm dan dihitung nilai Rf setiap bercak yang teramati. Penampak bercak dapat juga menggunakan asam sulfat 10% dalam methanol (Fikayuniar, 2020).

Untuk menghitung nilai Rf yaitu dengan menggunakan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak garis depan dari titik awal}}$$

Nilai RF digunakan untuk mengidentifikasi adanya perbedaan senyawa dalam sampel. Jika suatu identifikasi memiliki nilai RF yang sama maka senyawa tersebut dikatakan memiliki karakteristik yang sama atau memiliki kemiripan. Sedangkan jika nilai RF nya berbeda, maka senyawa tersebut adalah senyawa yang berbeda.

(Wulandari, 2011)

### 3.6.6 Fraksinasi Dengan Kromatografi Kolom

Prosedur fraksinasi dengan kromatografi kolom mengacu pada (Fikayuniar, 2020) yang dimodifikasi. N-Heksana : etil asetat dan etil asetat : etanol sebagai eluen disiapkan, dengan macam-macam komposisi yaitu 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 0:100 yang diperoleh dari data KLT. Sejumlah botol vial

ukuran 20 mL disiapkan dan ditimbang. Selanjutnya sejumlah ekstrak kental (gram) ditimbang lalu dilarutkan dalam sedikit eluen atau pelarut lain.

Kemudian sejumlah adsorben silika gel 60 ditimbang dan dimasukkan ke dalam sebagian eluen, diaduk hingga diperoleh lumpuran adsorben. Selanjutnya ujung kolom disumbat dengan kapas bebas lemak, lumpuran adsorben dimasukkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit hingga diperoleh adsorben yang padat dan tidak ada udara yang terjebak.

Tahap berikutnya yaitu penambahan eluen sedikit demi sedikit diatas permukaan larutan ekstrak sampai permukaan eluen minimum sekitar 2 cm. Setelah itu kran dibuka lalu eluen akan turun (eluen diatas permukaan adsorben tidak boleh sampai kering dan selalu melakukan penambahan eluen pada bagian atas kolom). Kemudian fraksi ditampung pada botol vial, fraksi yang diperoleh dipisahkan dan ditimbang untuk selanjutnya dilakukan pemantauan fraksi dengan KLT dan dilihat warna bercak dibawah sinar tampak, sinar UV  $\lambda 254$  nm dan  $\lambda 366$  nm dengan penampang bercak spesifik. (Fikayuniar, 2020).

### 3.6.7 Pemurnian Dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

KLT preparatif digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah gram. Cara melakukan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) pertama siapkan bejana (*chamber*) lalu lapisi bejana dengan kertas saring kemudian siapkan fase gerak atau pengembang (pelarut

tunggal atau pelarut campuran). Masukkan fase gerak atau pengembang ke dalam bejana dan tutup rapat. Biarkan bejana jenuh dengan uap eluen. Kemudian siapkan plat silika gel 60 GF<sub>254</sub> preparatif selanjutnya siapkan sejumlah fraksi atau subfraksi kental dilarutkan dalam beberapa mL pelarut, sampai diperoleh ekstrak yang tidak terlalu kental dan tidak encer.

Totolkan fraksi atau subfraksi secara tidak terputus pada plat KLT preparatif dengan menggunakan pipa kapiler, sehingga berbentuk pita (tebal pita maksimum 5 mm). Biarkan totolan fraksi/subfraksi mengering (fase gerak atau pengembang menguap) setelah itu masukkan plat yang sudah ditotolkan ke dalam bejana. Biarkan fase gerak/pengembang naik sampai sekitar 2 cm sebelum pinggir plat lalu angkat plat, biarkan plat mengering (fase gerak/pengembang menguap).

Lihat warna-warna pita di bawah sinar tampak sinar UV  $\lambda$ 254 nm,  $\lambda$ 366 nm atau semprot bagian pinggir kiri dan kanan plat dengan penampak bercak universal asam sulfat 10% dalam metanol atau penampak bercak spesifik/khusus. Kerok pita senyawa yang akan diisolasi, kumpulkan pada suatu wadah. Masukkan pelarut tertentu kedalam wadah yang berisi kerokan pita, aduk sehingga senyawa yang akan diisolasi sedangkan serbuk akan diisolasi dapat terekstraksi sedangkan serbuk silika gel tidak larut. Saring dengan kertas saring, sehingga sebagian besar serbuk silika gel akan tertahan di kertas saring.

Ulangi penyaringan berkali-kali dengan kapas, sehingga tidak terdapat partikel serbuk silika gel dalam larutan.

### 3.6.8 Karakterisasi Dengan Kromatografi 2 Dimensi

Sejumlah isolat dilarutkan dalam beberapa mL pelarut sampai diperoleh larutan yang tidak terlalu kental dan tidak terlalu encer. Disiapkan pelat silika gel GF<sub>254</sub> lalu larutan ditotolkan pada pelat dengan menggunakan pipa kapiler. Totolan dibiarkan mengering (fase gerak / pengembang menguap), selanjutnya pelat yang sudah ditotolkan dimasukkan ke dalam bejana (Tinggi permukaan fase gerak/ pengembang dalam bejana harus lebih rendah dari pada totolan bercak). Totolan dibiarkan mengering (fase gerak atau pengembang) naik sampai sekitar 2 cm sebelum pinggir plat. Kemudian plat diangkat dan dibiarkan mengering (fase gerak menguap). Warna bercak dilihat di bawah sinar tampak, sinar UV  $\lambda$ 254 nm,  $\lambda$ 366 nm. Setelah itu pelat diputar 90°C (tegak lurus), sampel murni jika kromatogram pada kedua macam fase gerak/pengembang hanya menunjukkan satu bercak (Fikayuniar, 2020).

### 3.7 Penentuan Titik Lebur (*Melting Point*)

Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan alat *Melting-Temp Electrothermal*. Sejumlah isolat dimasukkan pipa kapiler tempat senyawa yang salah satu ujungnya tertutup, kemudian dimasukkan ke alat yang telah dihubungkan dengan sumber listrik dan saklar pada posisi hidup. Alat diatur pada suhu °C tertentu dibawah titik lebur zat yang diamati, suhu diamati ketika senyawa mulai meleleh seluruhnya. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali

dengan menurunkan suhu alat kemudian dilakukan pengulangan. Jarak lebur dihitung yaitu suhu saat zat mulai meleleh sampai dengan zat meleleh semua (isolat dikatakan sudah murni jika selisihnya 1-2°C) (Fikayuniar, 2020).

### 3.8 Identifikasi Dengan Spektrofotometri UV-Vis

Sejumlah pelarut A dimasukkan kedalam kuvet sebagai blanko, serapan blanko diukur pada  $\lambda$  200-400 nm /  $\lambda$  400-800 nm (hasil pengukuran blanko sebaiknya berupa garis lurus). Sejumlah isolat X dilarutkan dalam pelarut A (sampel). Selanjutnya serapan serapan larutan sampel dalam pelarut A pada  $\lambda$  200-400 nm dan  $\lambda$  400-800 nm (diperoleh spektrum UV-Vis isolat X dalam pelarut A) diukur dan dibandingkan dengan literatur (Fikayuniar, 2020).

### 3.9 Identifikasi Dengan Spektrofotometri IR

Isolat dicampur dengan kalium bromida (KBr) menggunakan alat mixture vibrator, kemudian dicetak menjadi pellet lalu dimasukkan ke dalam alat spektrofotometri IR selanjutnya diukur spektrum inframerah pada bilangan gelombang 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  (Bahrul & Sukmawati, 2016).

### 3.10 Diagram Alir Penelitian



