

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam karakterisasi metabolit sekunder pada ekstrak etanol batang kangkung pagar (*ipomoea carnea* Jacq.) yaitu penelitian eksperimental. Pengujian yang dilakukan terhadap sampel yaitu, penentuan kadar air, ekstraksi, skrining fitokimia, fraksinasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kromatografi kolom, KLT 2 dimensi, KLT preformatif, uji kemurnian dan karakterisasi / identifikasi.

#### 3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia batang kangkung pagar (*ipomoea carnea* Jacq.) yang dibeli dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat yang beralamat di Jl. Tentara Pelajar No.3 Bogor, Jawa Barat.

#### 3.3 Bahan dan Alat

##### 3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.), pelarut etil asetat (Brataco), pelarut etanol 96% (Brataco) pelarut n-heksan (Brataco), silica gel 60 GF254, silica gel 60 (0,063-0,200mm),  $\text{CHCl}_3$  pa, HCl 2N, aquadest (brataco), pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi *Lieberman Buchard*, gelatin,  $\text{FeCl}_3$  1%, Natrium Hidroksida (NaOH) 10%, Amonia, KOH, pereaksi Sitroborat, Methanol pa, Serbuk Magnesium, Amil alkohol (1-Pentanol), plat KLT (TLC silica gel 60 F254 merk 1.05554.0001), kertas saring (*whatman*), pipa kapiler, pipa kapiler *melting point*, alumunium foil (klinpak).

##### 3.3.2 Alat Penelitian

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 160mg

maksimum 220g, *meting point* m3000 (kruss), penjepit tabung reaksi, oven (gemmyco yco-no1), tabung kolom kromatografi, plat tetes, pipet tetes, pipet volume (pyrex), cawan penguap, statif, klem, corong (pyrex), kertas perkamen, kuvet (thermo scientific), kaca arloji, mortir, stamfer, lampu uv (254-366 nm) sebagai penampaknoda (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), *Fourier-Transform Infrared Spectrometer* (FTIR), botolvial 20ml dan botol coklat 100ml.

### **3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan alam farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan pada bulan April-Juli tahun 2022.

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu fraksi dan subfraksi dari ekstrak etanol batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.).

#### **3.5.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini berupa penentuan susut pengeringan, ekstraksi, skrining fitokimia, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis preparatif, kromatografi lapis tipis 2 dimensi, Penentuan titik lebur, karakterisasi dan identifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan IR.

#### **3.5.3 Definisi Operasional Variabel**

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

**Tabel 3. 1** Tabel Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
<b>Variabel Bebas</b>					
1	Fraksi	Fraksi diperoleh dari hasil fraksinasi	Kromatografi kolom	Nominal	1. n-heksana 2. n-heksana : etil asetat 3. Etil asetat
2	Sub fraksi	Sub fraksi diperoleh dari fraksinasi 2	Kromatografi kolom	Nominal	1. n-heksana 2. n-heksana : etil asetat 3. Etil asetat
<b>Variabel Terikat</b>					
1	Penentuan susut pengeringan	Perhitungan persentase kadar air sampel	Gravimetri	Rasio	% (Persen)
2	Rendemen ekstrak	Perbandingan berat etotal ekstrak dan berat simplisia	Cawan dan timbangan analitik	Rasio	% (Persen)
3	Pemeriksaan alkaloid	mengidentifikasi kandungan senyawa alkaloid dalam sampel	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
4	Pemeriksaan flavonoid	mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid dalam sampel	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
5	Pemeriksaan	mengidentifikasi	Pereaksi	Nominal	1. Positif

	tanin dan polifenol	asi kandungan senyawa Tanin dan polifenol dalam sampel			2. Negatif
6	Pemeriksaan kuinon	mengidentifikasi asi kandungan senyawa kuinon dalam sampel	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
7	Pemeriksaan saponin	mengidentifikasi asi kandungan senyawa saponin dalam sampel	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
8	Pemeriksaan monoterpenoid dan sesquiterpenoid	mengidentifikasi asi kandungan senyawa monoterpenoid dan sesquiterpenoid dalam sampel	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
9	Pemeriksaan triterpenoid dan steroid	mengidentifikasi asi kandungan senyawa triterpenoid dan steroid dalam sampel	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
10	Kromatografi lapis tipis	Pemantauan ekstrak	Pelat silika gel, ekstrak cair, lampu UV	Rasio	Nilai Rf
11	Kromatografi kolom	Fraksinasi	Konsentrasi eluen, ekstrak kental, silika gel, lampu UV	Rasio	Nilai Rf
12	Kromatografi	Pemurnian	Kertas saring,	Rasio	Isolat

	lapis tipis preparatif		sub fraksi, silika gel		
13	Kromatografi lapis tipis 2 dimensi	Karakterisasi	Isolat, silika gel, lampu UV	Rasio	Isolat
14	Penentuan titik lebur	Uji titik leleh	Isolat, <i>Melting-Temp Electrothermal</i>	Rasio	suhu °C
15	Spektrofotometri UV-Vis	Identifikasi	Spektrofotometri UV-Vis	Rasio	Panjang gelombang (nm)
16	Spektrofotometri IR	Identifikasi	Spektrofotometri IR	Rasio	Bilangan gelombang (cm <sup>-1</sup> )

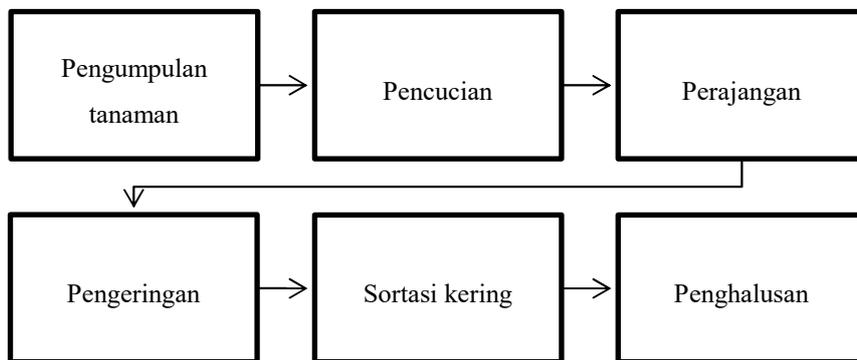
### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Determinasi

Tumbuhan kangkung pagar dideterminasi terlebih dahulu di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu untuk mengetahui jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas.

#### 3.6.2 Persiapan Sampel

Tahapan persiapan sampel dapat dilihat pada Gambar 3.1. Sebanyak 1 kg batang kangkung pagar dibersihkan dari pengotor dengan cara dicuci di bawah air mengalir hingga bersih, ditiriskan, 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.



**Gambar 3. 1**Persiapan Sampel

### 3.6.3 Penentuan Susut pengeringan

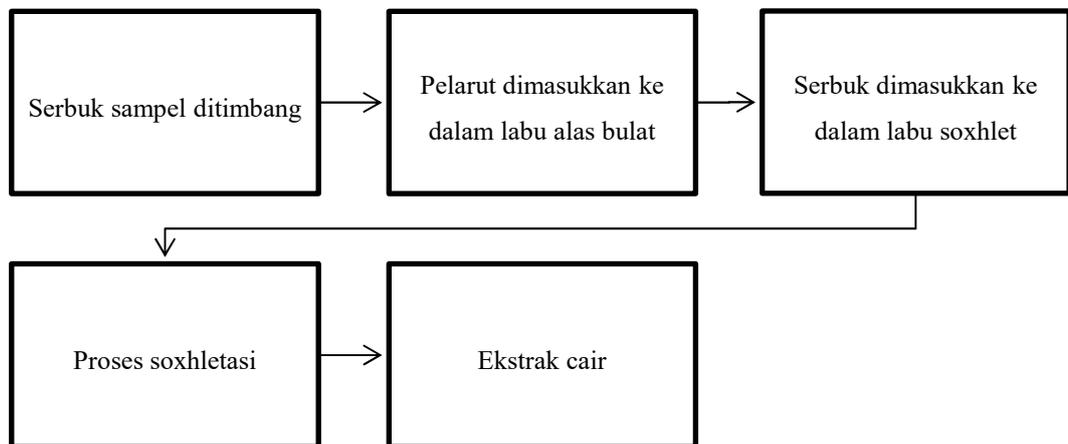
Prosedur penentuan susut pengeringan megacu pada Sudarmadji, dkk (1997) yang dimodifikasi. Penentuan kadar air menggunakan metode gravimetri. Cawan porselen dikeringkan didalam oven selama 30 menit kemudian didinginkan didalam desikator selama 15 menit, lalu cawan porselen ditimbang. Sebanyak 5 g sampel 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 didinginkan 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 g dari penimbangan pertama maka dianggap konstan. Tetapi bila tidak, maka dilakukan penimbangan kembali hingga diperoleh pengurangan bobot dua penimbangan berturut (Sudarmadji, dkk, 1997). Untuk perhitungan presentase kadar air dihitung dengan rumus :

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

### 3.6.4 Ekstraksi

Prosedur ekstraksi pada Gambar 3.2 mengacu pada fikayuniar (2020) yang dimodifikasi. 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 1/2 - 2/3 bagian volume labu dan ditambahkan batu didih. Selanjutnya beberapa gram simplisia di basahi dengan pelarut sama banyak dengan simplisia yang digunakan (banyak simplisia : banyak pelarut untuk membasahi simplisia (1:1) disesuaikan dengan kapasitas alat soxhlet. Setelah itu alat soxhlet dan penangas dipasang 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 kabu. Ekstraksi dilakukan sampai diperoleh ekstrak tidak berwarna. Ekstrak cair yang diperoleh disatukan dan dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak kental (Fikayuniar, 2020). Setelah ekstrak didapat selanjutnya dihitung rendemen ekstrak untuk menentukan perbandingan ekstrak yang diperoleh terhadap berat awal bahan simplisia. Rendemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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



**Gambar 3. 2** Ekstraksi

### 3.6.5 Skrining fitokimia

Prosedur skrining fitokimia mengacu kepada Fikayuniar (2020) dan Harbone (2006) yang dimodifikasi. Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang ada pada ekstrak batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.). Tahapan skrining fitokimia terdiri dari beberapa pemeriksaan yaitu :

#### 1. Pemeriksaan Alkaloid

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 1 g lalu dibasakan dengan ammonia lalu digerus menggunakan mortar, kemudian di tambahkan 5 mL kloroform gerus kuat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring menggunakan pipet yang disumbat dengan kapas, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan kedalamnya HCl 2N (1:10 v/v), dikocok kuat hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi 3 bagian. Filtrat 1 ditambahkan pereaksi mayer, adanya alkaloid ditunjukkan dengan terjadinya kekeruhan atau endapan putih. Filtrat 2 Filtrat 2 ditambahkan pereaksi dragendorff, adanya alkaloid

ditunjukkan dengan terjadinya endapan jingga coklat. Untuk filtrat 3 digunakan sebagai blanko (Fikayuniar,2020., Harbone 2006).

## 2. Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 1 g serbuk simplisia ditambahkan 50 mL air panas, di didihkan selama 5 menit lalu disaring. Setelah itu filtrate yang dihasilkan ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 5 mL HCl 2N. Kemudian ditambahkan amilalkohol, lalu dikokok kuat-kuat dan dibiarkan hingga memisah. Adanya flavonoid dalam sampel ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah (atau warna suatu ekstrak tertentu) yang dapat ditarik dengan amilalkohol (Fikayuniar,2020 , Harbone 2006).

## 3. Pemeriksaan Polifenolat

Sebanyak 50 mg serbuk simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dididihkan dalam 50 mL air selama 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring maka diperoleh filtrat A. Kedalam filtrate ditambahkan larutan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%, adanya polifenolat dalam sampel ditandai dengan terbentuknya warna biru hitam (Fikayuniar 2020).

## 4. Pemeriksaan Tanin

Kedalam filtrat A ditambahkan larutan gelatin 1%, adanya tanin dalam sampel ditandai dengan terbentuknya endapan putih (Fikayuniar 2020).

## 5. Pemeriksaan Kuinon

Kedalam filtrat A ditambahkan larutan KOH 5%, adanya kuinon dalam sampel ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah (Fikayuniar 2020).

## 6. Pemeriksaan Saponin

Sejumlah filtrat A dalam tabung reaksi dikocok secara vertikal, adanya golongan saponin dalam sampel ditandai dengan terbentuknya busa yang persisten pada penambahan asam klorida atau pada pendiaman selama 10 menit (Fikayuniar 2020, Harbone, 2006).

#### 7. Pemeriksaan monoterpenoid dan sesquiterpenoid

Sebanyak 1 g simplisia digerus dengan 5 mL eter, kemudian dipipet yang disumbat dengan kapas diperoleh filtrate B. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Selanjutnya kedalam residu diteteskan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat melalui pinggir cawan. Adanya monoterpenoid dan sesquiterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna-warna (Fikayuniar 2020).

#### 8. Pemeriksaan Triterpenoid dan Steroid

Sejumlah filtrate B ditempatkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Selanjutnya kedalam residu diteteskan 2-3 tetes pereaksi *Liebermann Buchard*, adanya golongan triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna ungu. Sedangkan jika terbentuk warna biru hijau menunjukkan adanya golongan steroid (Fikayuniar 2020, Harbone, 2006).

#### 3.6.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prosedur kromatografi lapis tipis (KLT) mengacu pada Fikayuniar (2020) yang dimodifikasi. Disiapkan pelat 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 G<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 R<sub>f</sub> setiap bercak yang teramati. Penampak bercak dapat juga menggunakan asam sulfat 10% dalam metanol (Fikayuniar, 2020). Untuk menghitung nilai R<sub>f</sub> yaitu dengan menggunakan rumus :

$$RF = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

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 (Lipsy, 2010)

### 3.6.7 Fraksinasi Dengan Kromatografi Kolom

Prosedur fraksinasi dengan kromatografi kolom mengacu pada Fikayuniar (2020), Houghton dan Raman (1998) yang dimodifikasi. n-Heksana : etil asetat dan etil asetat : etanol sebagai eluen disiapkan, dengan macam-macam komposisi yang diperoleh dari data KLT. Sejumlah botol vial ukuran 20 mL disiapkan dan ditimbang. Selanjutnya sejumlah ekstrak kental (v gram) ditimbang lalu dilarutkan dalam sedikit eluen atau pelarut lain. Kemudian sejumlah adsorben silika gel 60 (w gram) 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. Eluen diturunkan sampai lapisan tipis permukaan eluen diatas permukaan adsorben lalu kran di tutup. Cuplikan fraksi yang akan dipisahkan ditimbang sebanyak 1/20 dari berat silika gel 60 dan dimasukkan ke dalam kolom dengan cara kering yaitu : cuplikan dikeringkan dengan sedikit silika dan digerus hingga homogen, lalu sampel dimasukkan dengan hati-hati diatas penjerap hingga membentuk lapisan tipis merata. 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-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, 366 nm dengan penampak bercak spesifik / khusus (Fikayuniar, 2020., Houghton dan Raman,1998).

### 3.6.8 Pemurnian Dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Prosedur pemurnian dengan kromatografi lapis tipis preparatif mengacu pada Fikayuniar (2020) yang dimodifikasi. Disiapkan bejana (chamber) yang dilapisi dengan kertas saring. Fase gerak / pengembang yang disiapkan adalah pelarut tunggal atau campuran kemudian dimasukkan ke dalam bejana dan ditutup rapat hingga jenuh dengan uap eluen. Pelat silika gel 60 GF<sub>254</sub> preparatif disiapkan, lalu sejumlah fraksi / subfraksi kental dilarutkan dalam beberapa mL pelarut hingga diperoleh ekstrak yang tidak terlalu kental dan tidak encer.

Fraksi / subfraksi ditotolkan secara tidak terputus pada pelat KLT preparatif dengan menggunakan pipa kapiler, sehingga membentuk pita (tebal pita maksimum 5 mm). Totolan fraksi / subfraksi dibiarkan hingga mengering (fase gerak / pengembang menguap). Pelat yang sudah ditotolkan dimasukkan kedalam bejana, tinggi permukaan fase gerak / pengembang dalam bejana harus lebih rendah daripada totolan bercak. Fase gerak / pengembang dibiarkan naik sampai sekitar 2 cm sebelum pinggir pelat. Selanjutnya pelat diangkat dan dibiarkan mengering (fase gerak / pengembang menguap), lalu dilihat warna-warna pita di bawah sinar tampak, sinar UV  $\lambda$ 254 nm, 366 nm atau bagian pinggir kiri dan kanan pelat disemprot dengan penampak bercak universal asam sulfat 10% dalam etanol atau penampak bercak spesifik / khusus (pada waktu menyemprot bagian pinggir kiri dan kanan pelat, bagian tengah pelat ditutup).

Pita senyawa yang akan diisolasi dikerok dan dikumpulkan dalam wadah lalu dimasukkan pelarut tertentu kedalamnya, diaduk hingga senyawa yang diisolasi dapat terekstraksi sedangkan serbuk silika gel tidak larut (didiamkan beberapa jam). Setelah itu disaring dengan kertas saring hingga bagian serbuk silika gel akan tertahan dikertas saring. Penyaringan diulangi

berkali-kali dengan kapas, sehingga tidak terdapat partikel serbuk silika gel dalam larutan (Fikayuniar, 2020).

### 3.6.9 Karakterisasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis 2 Dimensi

Prosedur karakterisasi dengan kromatografi lapis tipis 2 dimensi mengacu pada Fikayuniar (2020) yang dimodifikasi. 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 / pengembang) naik sampaiselkitar 2 cm sebelum pinggir pelat. Kemudian pelat diangkat dan dibiarkan mengering (fase gerak / pengembang menguap). Warna bercak dilihat di bawah sinar tampak, sinar UV  $\lambda_{254}$  nm, 366 nm. Setelah itu pelat diputar 90°C (tegak lurus), sampel murni jika kromatogram pada kedua macam fase gerak / pengembang hanya menunjukkan 1 bercak (Fikayuniar, 2020).

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

Prosedur penentuan titik lebur (*melting point*) mengacu pada Fikayuniar (2020) yang dimodifikasi. 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. Reflikasi 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).

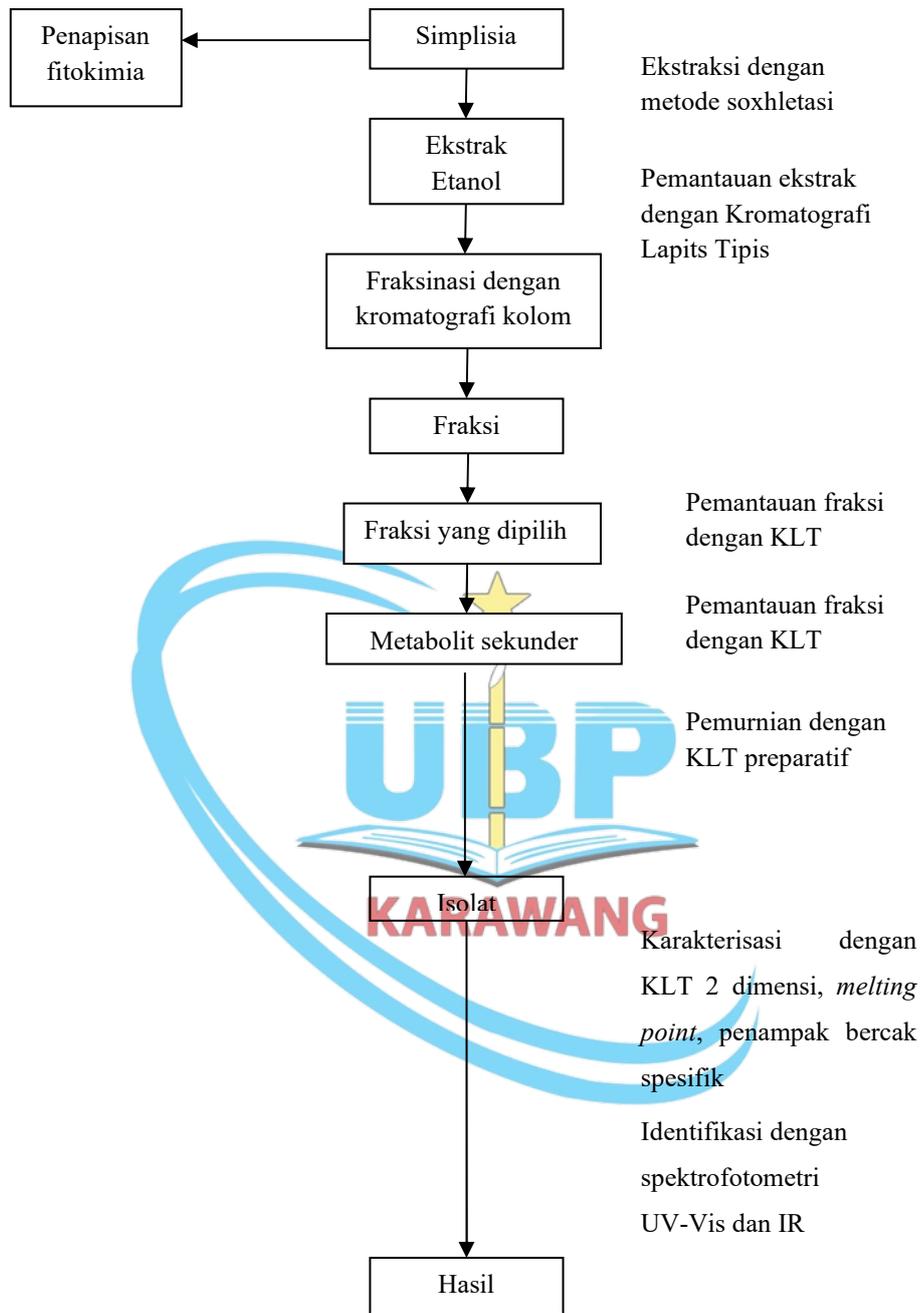
### 3.6.11 Identifikasi Dengan Spektrofotometri UV-Vis

Prosedur identifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis mengacu pada Fikayuniar (2020) yang dimodifikasi. Sejumlah pelarut A dimasukkan ke dalam 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 /  $\lambda$  400-800 nm (diperoleh spektrum UV-Vis isolat X dalam pelarut A) diukur dan dibandingkan dengan literatur (Fikayuniar, 2020).

### 3.6.12 Identifikasi Dengan Spektrofotometri IR

Prosedur identifikasi dengan spektrofotometri IR mengacu pada Watson (2005) yang dimodifikasi. 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  $\text{cm}^{-1}$  (Watson, 2005).

Berikut ini pada Gambar 3.3 adalah skema penelitian karakterisasi metabolit sekunder pada ekstrak etanol batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* jacq.) :



**Gambar 3.3** Skema Penelitian