

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam karakterisasi metabolit sekunder pada ekstrak n-heksana batang kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) menggunakan penelitian praeksperimental. Pengujian yang dilakukan terhadap sampel yaitu penentuan kadar air, ekstraksi, skrining fitokimia, kromatografi lapis tipis, fraksinasi dengan kromatografi kolom, pemurnian, dan identifikasi.

3.2 Sampel

Bahan baku yang digunakan sebagai sampel penelitian ini adalah simplisia batang kangkung pagar yang diperoleh di 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-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang kangkung pagar, pelarut n-heksana, etil asetat, asam sulfat, asam klorida pekat, aquadest, besi (III) klorida (FeCl_3), Ammonia (NH_4), magnesium (Mg), amil alkohol (1-Pentanol) ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$), kloroform, natrium hidroksida (NaOH) 10%, asam asetat glasial, alumunium poil, silica gel, preagen sitoborat, preagen dragendorff, preagen mayer, dan reagen *liberman buchard*.

3.3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan bahan, neraca analitik (Mettler Toledo), labu Erlenmeyer (pyrex), vacuum rotary evaporator (Eyela OSB-2100), tabung reaksi, oven (Gemmyco YCO-NO1), corong, kolom kromatografi, botol vial 10ml, plat KLT (TLC Silica Gel 60 F254 Merck 1.05554.0001), batang pengaduk, spatula, gelas ukur (pyrex), botol coklat, pipet tetes, pipet ukur, pipet volum, beaker glass, chumber, kertas saring, pipa kapiler, rak tabung, dan Spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific 33-PPPTS2017-L205-0006).

3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan April Tahun 2022.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu ekstrak, fraksi dan subfraksinasi.

3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pengujian penentuan kadar air, ekstraksi, skrining fitokimia, kromatografi lapis tipis, fraksinasi kromatografi kolom, uji kemurnian, identifikasi dan karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan IR.

3.6 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
Variabel Bebas					
1	Fraksi	Fraksi diperoleh	Kromatografi kolom	Nominal	1. n-heksana 2. n-heksana : etil asetat 3. Etil asetat
2	Subfraksi	Sub fraksi diperoleh dari fraksinasi 2	Kromatografi kolom	Nominal	1. n-heksana 2. n-heksana : etil asetat 3. Etil asetat
Variabel Terikat					
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 2. Negatif
3.	Kromatografi kolom	Fraksinasi	Konsentrasi eluen, ekstrak kental, silika gel, lampu UV	Rasio	Nilai Rf
4.	Kromatografi lapis tipis preparatif	Pemurnian	Kertas saring, subfraksi, silika gel,	Rasio	Isolat
5.	Kromatografi lapis tipis 2 dimensi	Karakterisasi	Isolat, silica gel, lampu UV	Rasio	Isolat
6.	Penentuan titik lebur	Uji titik leleh	Isolat, <i>Melting-Temp</i>	Rasio	Suhu °C

Electrotherm

al

7.	Spektrofotometri UV-Vis	Identifikasi	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	Panjang gelombang (nm)
8.	Spektrofotometri IR	Identifikasi	Spektrofotometer IR	Rasio	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)

3.7 Determinasi

Batang kangkung pagar dideterminasi terlebih dahulu di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), determinasi tumbuhan dimaksudkan untuk mendapatkan jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan Sampel

Sampel batang kangkung pagar segar langsung dirajang dan dikeringkan dengan menggunakan oven bersuhu 40°C hingga kadar airnya kurang dari 10 %. Setelah kering sampel dihaluskan menggunakan penggilingan. Sampel yang telah dihaluskan kemudian disimpan di wadah tertutup baik untuk selanjutnya diuji fitokimia.

3.8.2 Penentuan Kadar air

Penentuan kadar air dilakukan dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105 - 110°C selama 3 jam atau sampai didapat berat yang konstan (bobot tetap). Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan

adalah banyaknya air yang diuapkan (Winarno, 1992). Pengeringan sampai bobot tetap berarti pengeringan harus dilanjutkan hingga pada perbedaan dua kali penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,50mg untuk tiap gram zat yang digunakan, penimbangan kedua dilakukan setelah dipanaskan lagi selama satu jam. (Ditjen POM, 1995)

Cara ini relatif mudah dan murah. Kelemahan cara ini adalah bahan lain disamping air juga ikut menguap dan ikut hilang bersama dengan uap air misalnya alkohol, asam asetat, minyak atsiri dan lain-lain. Selain itu, dapat terjadi reaksi selama pemanasan yang menghasilkan air atau zat yang mudah menguap lainnya serta bahan yang dapat mengikat air secara kuat sulit melepaskan airnya meskipun sudah dipanaskan. (Sudarmadji *et al.*, 1989)

Kemudian dihitung presentase kadar air dengan menggunakan rumus :

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

3.8.3 Skrining Fitokimia

Uji fitokimia terdiri dari alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoid. (Harborne, 1987)

1. Identifikasi Alkaloid

500 mg serbuk simplisia ditimbang, ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air, dipanaskan di atas penangas air selarna 2 menit, didinginkan dan disaring. Dipindahkan 3 ml filtrat pada kaca arloji

kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, jika terjadi endapan coklat maka simplisia tersebut mengandung alkaloid. Jika dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam methanol maka ada kemungkinan terdapat alkaloid.

2. **Identifikasi Flavonoid**

1 ml larutan diuapkan, sisa dilarutkan dalam 1-2 ml etanol (95%) P, ditambahkan 500 mg serbuk seng dan 2 ml, asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit, ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat, jika dalam 2-5 menit terbentuk warna merah berarti mengandung flavonoid.

3. **Identifikasi Tanin**

500 mg serbuk simplisia ditimbang, ditambahkan 50 ml aquadest, dididihkan selama 15 menit lalu didinginkan. Dipindahkan 5 ml filtrat pada tabung reaksi, diteteskan pereaksi besi (III) klorida, bila terjadi warna hitam kehijauan menunjukkan adanya golongan senyawa tanin.

4. **Identifikasi Saponin**

1 g serbuk simplisia ditimbang lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik terbentuk buih putih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, pada

penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang, menunjukkan bahwa dalam simplisia tersebut mengandung saponin.

5. Identifikasi Steroid/Triterpenoid

1 g serbuk simplisia ditimbang, ditambahkan 20 ml eter dan dimaserasi selama 2 jam, dipindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji, ditetaskan pereaksi Lieberman-Burchard (asam asetat glasial-asam sulfat pekat), bila terbentuk warna merah menunjukkan senyawa steroid atau hijau menunjukkan senyawa triterpenoid.

3.8.4 Ekstraksi

Pembuatan ekstrak batang kangkung pagar dilakukan dengan metode soxhlet batang kangkung pagar yang telah di keringkan dan dihaluskan selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana. Dituangkan pelarut pengestraksi kedalam labu alat bulat samapi kurang lebih $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ bagian volume labu dan ditambahkan batu didih, simplisia dibasahi dengan 1:1 pelarut sama banyak dengan simplisia yang digunakan. Dipasang alat soxhlet dan penangas kemudian nyalakan *heating mantle* sampai suhu mencapai titik didih pelarut, pelarut akan mendidih, menguap, mengembun melalui kondensor lalu menetes melalui simplisia dan menarik komponen simplisia. Tetesan pelarut yang berisi komponen yang terekstraksi jatuh kedalam labu. Ekstraksi dilakukan sampai diperoleh ekstrak yang tidak berwarna. (Fikayuniar, 2020)

Rendemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

3.8.5 Pemantauan Ekstrak dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemantauan Ekstrak dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pertama disiapkan plat silica 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 ditutulkan pada garis awal dengan menggunakan pipa kapiler, biarkan beberapa saat hingga pelarutnya menguap. Kemudian plat silica dimasukkan kedalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan cairan pengembang, proses kromatografi dihentikan sampai cairan pengembang sampai ke garis depan. Amati pola kromatografi dibawah lampu UV λ 254 dan 366 nm, kemudian hitung nilai Rf. (Fikayuniar, 2020)

Rumus Rf :

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

3.8.6 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Fraksinasi dengan kromatografi kolom pertama disiapkan sejumlah botol vial ukuran 20 mL, kemudian botol vial 20 mL masing-masing ditimbang. Lalu ditimbang sejumlah ekstrak kental (gram), dimasukkan sebagian kedalam eluen (point a). Ditimbang sejumlah adsorben silica gel (gram) dimasukkan ke dalam sebagian eluen, diaduk, diperoleh lumpuran adsorben. Ujung kolom disumbat dengan kapas bebas lemak.

Lumpuran adsorben dimasukan sedikit demi sedikit kedalam kolom, sampai diperoleh adsorben yang padat dan tidak ada udara yang terjebak. eluen diturunkan sampai lapisan tipis permukaan eluen diatas permukaan adsorben. Lalu kran ditutup. Cuplikan fraksinasi yang akan dipisahkan ditimbang sebanyak 1/20 dari berat silica dan dimasukan kedalam kolom dengan cara kering yaitu : cuplikan dikeringkan dengan sedikit silica dan digerus hingga homogen. Sampel dimasukan hati-hati diatas penjerap membntuk lapisan tipis merata. ditambahkan eluen sedikit demi sedikit, sampai permukaan eluen minimum sekitar 2 cm diatas permukaan larutan ekstrak. Kran dibuka kemudian eluen akan turun. Lalu fraksi-fraksi ditampung pada botol vial, fraksi yang diperoleh dipekatkan dan ditimbang. Lakukan pemantauan fraksi dengan KLT, kemudian lihat warna bercak dibawah sinar tampak, sinar UV λ 254 nm, 366 nm, dengan penampak bercak spesifik. (Fikayuniar, 2020)

3.8.7 Pemurnian dengan KLT Preparatif

Pemurnian dengan KLT preparatif dilakukan dengan menyiapkan bejana (chamber), kemudian bejana dilapisi dengan kertas saring, lalu disiapkan fase gerak/ pengembang (pelarut tunggal tatau campuran). Kemudian dimasukkan fase gerak/pengembang ke dalam bejana dan tutup rapat. Biarkan bejana jenuh dengan uap eluen. Disiapkan pelat silika gel GF254 preparatif. Sejumlah fraksi / subfraksi kental dilarutkan dalam beberapa mL pelarut, sampai diperoleh ekstrak yang tidak terlalu kental dan tidak encer, ditotolkan fraksi/subfraksi secara tidak terputus

pada pelat KLT preparatif dengan menggunakan pipa kapiler, sehingga berbentuk pita (tebal pita maksimum 5 mm). Dibiarkan totolan fraksi/subfraksi mengering (fase gerak/pengembang menguap), lalu dimasukkan pelat yang sudah ditotolkan ke dalam bejana (perhatian : tinggi permukaan fase gerak/pengembang dalam bejana harus lebih rendah dari pada totolan bercak). Biarkan fase gerak/pengembang naik sampai sekitar 2 cm sebelum pinggir pelat. Diangkat pelat, biarkan pelat mengering (fase gerak/pengembang menguap). Dilihat warna-warna pita di bawah sinar tampak, sinar UV λ 254 nm, 366 nm atau semprot bagian pinggir kiri dan kanan pelat dengan penampak bercak universal asam sulfat 10% dalam metanol atau penampak bercak spesifik/khusus. (Pada waktu menyemprot bagian pinggir kiri dan kanan pelat, tutup bagian tengah pelat). Pita senyawa yang akan diisolasi dikerok, kimpulan pada suatu wadah. Dimasukkan pelarut tertentu ke dalam wadah yang berisi kerokan pita, aduk, sehingga senyawa yang akan diisolasi dapat terekstraksi sedangkan serbuk silika gel tidak larut (diamkan beberapa jam). kemudian disaring dengan kertas saring, sehingga sebagian besar serbuk silika gel akan tertahan di kertas saring. Diulangi penyaringan berkali-kali dengan kapas, sehingga tidak terdapat partikel serbuk silika gel dalam larutan. (Fikayuniar, 2020)

3.8.8 Karakterisasi dengan KLT Dua Dimensi

Karakterisasi dengan KLT Dua dimensi dilakukan dengan sejumlah isolat dilarutkan dalam beberapa mL pelarut, sampai diperoleh larutan

yang tidak terlalu kental dan tidak terlalu encer. Siapkan pelat silika gel GF254 Totolkan larutan pada pelat dengan menggunakan pipa kapiler. Biarkan totolan mengering (fase gerak / pengembangan menguap) Masukkan pelat yang sudah ditotolkan ke dalam bejana (perhatian : tinggi permukaan fase gerak/pengembang dalam bejana harus lebih rendah dari pada totolan bercak). Totolan dibiarkan mengering (fase gerak / pengembangan) naik sampai sekitar 2 cm sebelum pinggir plat. plat diangkat, biarkan plat mengering (fase gerak/pengembang menguap). Dilihat warna bercak di bawah sinar tampak, sinar ultraviolet λ 254 nm, 366 nm. Kemudian plat diputar 90° C (tegak lurus), dilakukan hal yang sama dengan menggunakan plat yang berbeda dengan fase gerak/pengembang ke 2 (fase gerak/pengembang ke 2 lebih polar dari pada fase gerak/pengembang ke 1). Sampel kemungkinan murni jika kromatogram pada kedua macam fase gerak/pengembang di atas hanya menunjukkan 1 bercak. (Fikayuniar, 2020)

3.8.9 Penentuan Titik Lebur (*Melting Point*)

Pemeriksaan penentuan titik lebur 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 $^\circ\text{C}$ 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)

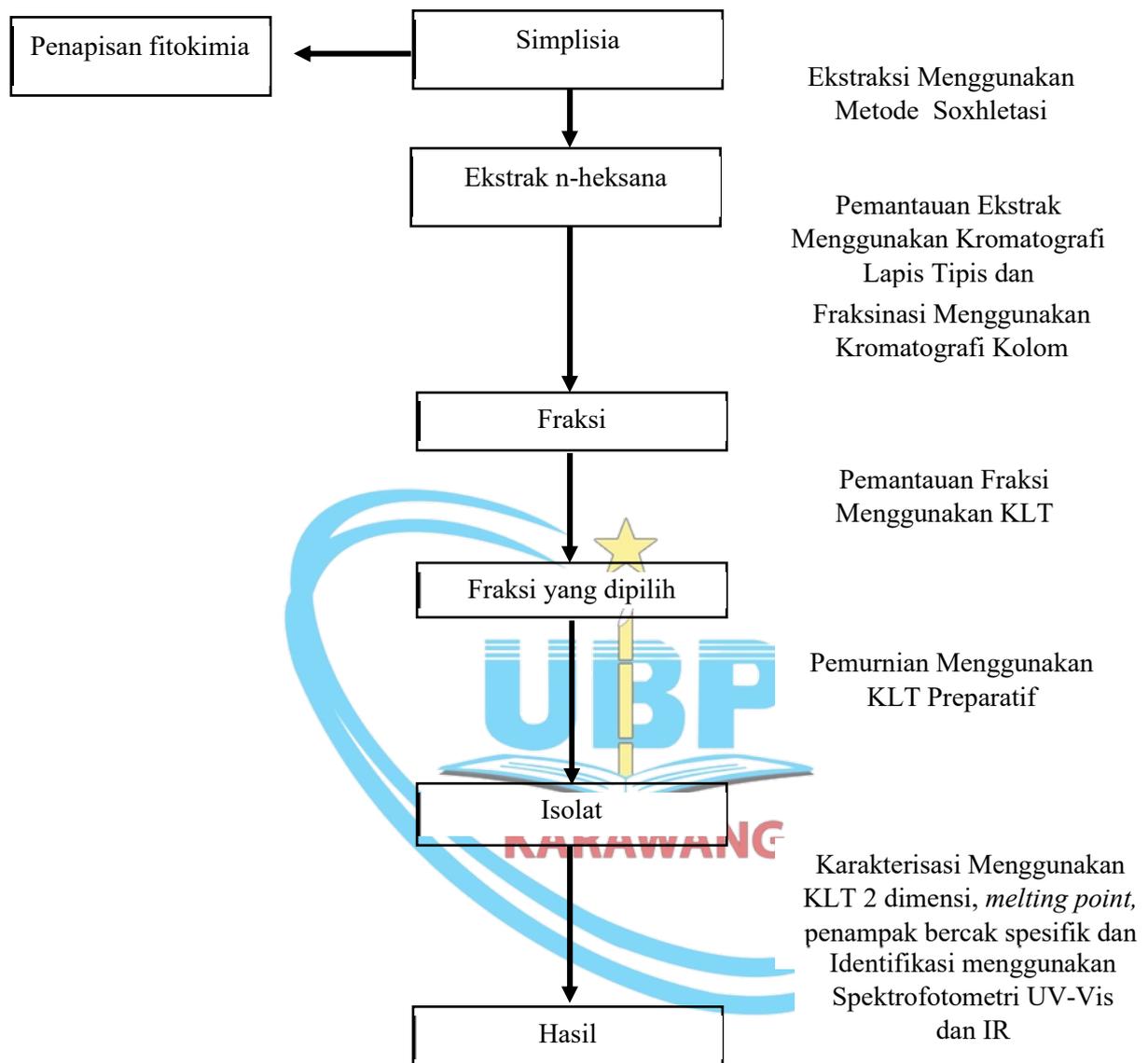
3.8.10 Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis

Identifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan sejumlah pelarut A dimasukkan ke dalam kuvet (blanko), diukur serapan blanko pada 200-400 nm, sejumlah isolate X dilarutkan dalam pelarut A (sampel), serapan larutan sampel diukur dalam pelarut A pada 200-400 nm (diperoleh spectrum ultraviolet-sinar tampak isolate X dalam pelarut A), dan dibandingkan dengan literatur. (Fikayuniar, 2020)

3.8.11 Identifikasi dengan Spektrofotometri IR

Identifikasi dengan spektrofotometri IR dilakukan dengan sampel yang akan diuji dipreparasi terlebih dahulu. Preparasi dilakukan dengan membuat pelet pada sampel yang dicampur dengan KBr pada cawan porselen dan dihaluskan. Setelah sampel dan KBr tercampur dan menjadi halus dimasukkan ke dalam alat *press* untuk dicetak menjadi pelet. Setelah itu, pelet dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer IR yang diatur pada bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} . (Putri, 2015)

Berikut ini adalah skema metode penelitian :



Gambar 3.4 Skema Metode Penelitian

