

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan September 2019.

3.2. Alat dan bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan bahan, neraca analitik (ae-ADAM), labu Erlenmeyer, tabung reaksi, oven, maserator, corong, kolom kromatografi, botol vial 10 ml, plat KLT (TLC Silica ge 60 F₂₅₄ merck 1.05554.0001), lampu UV (λ 254 dan 366 nm) sebagai pengungkap noda, batang pengaduk, Spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific* 33-PPPTS2017-L205-0006) *Centrifuge* PLC-025, incubator 601 merck (Gemmyco), spatula, botol coklat, pipet tetes, pipet ukur, pipet volum, micro pipet, *Rotary Evaporator* (EYELA OSB-2100-CE), *water bath, chamber* dan alat-alat gelas ukur, beaker glass dan lainnya.

3.2.2. Bahan

Bahan yang akan di gunakan selama penelitian adalah bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq), pelarut methanol p.a, n-heksana, etil asetat, ammonia, kloroform, pereaksi dragen droff, pereaksi meyer, sito borat, (asam klorida pekat dan bubuk Magnesium), Amil Alkohol, untuk identifikasi flavonoid dan besi (III) flourida (FeCl₃ 0,1%), Kalium dihydrogen phospat (KH₂SO₄), Potassium Hexacyanoferrate (III) (K₃Fe(CN)₆, Natrium hidroksida (NaOH), aquadest, asam sulfat encer, Vitamin C p.a (*Coated Ascorbic Acid* Type Ec. Code 0425117 analysis 06202961), etanol p.a, buffer pospat, *trichloroacetic acid* (TCA), kertas saring, kapas dan alumunium foil.

3.3. Persiapan Sampel

Tanaman kangkung pagar dideterminasi terlebih dahulu di Determinasi tumbuhan dimaksudkan untuk mendapatkan jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas. Tanaman bunga kangkung pagar ini di determinasi di Laboratorium Institut Teknologi Bandung Fakultas Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati.

Sampel bunga kangkung pagar segar langsung di rajang dan dikeringkan disuhu ruangan dalam suhu ruangan pada suhu antara 20 °C sampai 25 °C selama 3-4 hari guna mengurangi kadar air yang terkandung didalamnya. Sampel yang telah dikeringkan, kemudian di haluskan menggunakan blander, yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga interaksi antara sampel dengan pelarut semakain besar guna mempercepat proses pelarutan senyawa yang di inginkan. Sampel yang telah dihaluskan disimpan di dalam wadah tertutup baik untuk studi lebih lanjut.

3.4. Ekstraksi Seyawa Metabolit Sekunder

Pembuatan ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) dilakukan dengan metode maserasi, yaitu bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) dirajang, kemudian ditimbang, kemudian di ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol dengan cara maserasi secara berturut-turut. Masukkan sampel bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) kedalam maserator (Markham, 1988).

- A. Pelarut n-heksana dituang secara perlahan kedalam maserator. Selanjutnya, dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, kemudian dilakukan remaserasi selama empat hari hingga bening, kemudian disari kedalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator dibawah titik didih sampai di peroleh ekstrak kental
- B. Pelarut etil asetat dituang secara perlahan kedalam maserator. Setelahnya, diberikan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, lalu dilakukan remaserasi selama empat hari hingga bening, selanjutnya disari kedalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak

cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator dibawah titik didih sampai diperoleh ekstrak kental.

C. Pelarut metanol dituangkan secara perlahan kedalam maserator, selanjutnya dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, kemudian dilakukan remaserasi selama empat hari hingga bening, selanjutnya disari kedalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan menggunakan evaporator dibawah titik didih samapi diperoleh ekstrak kental

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui dan mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia maupun ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) skrining fitokimia yang dilakukan yaitu uji alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, polifenol, steroid, terpenoid, alkaloid. Berikut langkah skrining fitokimia (Harbone, 1987).

1. Flavonoid

A. Simplisia

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditambahkan NaOH 10%, tunggu beberapa saat, apabila terbentuk warna kuning, oranye atau merah menunjukkan adanya flavonoid (Marpaung, 2017).

B. Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 1 ml ditambahkan 3 ml etanol 70% dan dikocok, panaskan dalam penangas air kemudian disaring, filtrate kemudian ditambahkan pita Mg sebanyak 0,1 gram dan 2 tetes HCl pekat. Uji positif adanya senyawa flavonoid dengan adanya warna merah (Wardana *et al.*, 2016).

2. Polifenol

Sebanyak 1 mg ekstrak dilarutkan dalam etanol dan ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif ditandai dengan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam (Wardana *et al.*, 2016).

3. Alkaloid

Ekstrak bunga kangkung pagar sebanyak 1 ml ditambahkan 2 ml HCl 2N dan dikocok. Campuran dibagi menjadi 2 dalam tabung berbeda, masing masing tabung ditetesi reagen, tabung satu ditetesi reagen Mayer dan tabung dua ditetesi Dragendorf. Adanya senyawa senyawa alkaloid pada reagen Mayer terbentuk endapan kuning, dan pada penambahan reagen Dragendorff terbentuk endapan merah (Tiwari *et al.*, 2011).

4. Terpenoid

A. Simplisia

Sebanyak 2 ml kloroform ditambahkan dengan 1 ml infus rimapang bunga kangkung pagar ditambahkan dengan 3 ml H₂SO₄ pekat. lapisan dipermukaan atau antarmuka berwarna coklat kemerahan menunjukkan adanya terpenoid (Riaz *et al.*, 2015).

B. Ekstrak

Sebanyak 2 ml sampel, kemudian tambahkan 3 tetes HCl pekat 1 tetes H₂SO₄ pekat, jika larutan terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina, 2014).

5. Saponin

Sebanyak 5 ml infusa rimapang bunga kangkung pagar ditambahkan dengan 5 ml aquadest, lalu dikocok atau diaduk. Adanya buih menunjukkan adanya saponin (Riaz *et al.*, 2015).

6. Tanin

10 ml ekstrak ditambahkan 3 ml etanol. Lalu panaskan hingga mendidih selama 5 menit kemudian disaring. Untuk mengetahui adanya tanin dilakukan dengan dua pereaksi, yaitu pereaksi FeCl₃ dan gelatin. Ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1% beberapa tetes dalam filtrate. Adanya tanin ditunjukkan dengan adanya warna hijau kehitaman (Habibi, 2017).

7. Steroid

2 ml sampel yang telah diekstraksi ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Jika terbentuk warna hijau maka positif mengandung steroid (Ergina, 2014).

3.6. Fraksinasi dengan kromatografi kolom

Fraksinasi adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah n-heksana, etil asetat dan metanol. Untuk menarik lemak dan senyawa non polar digunakan n-heksana, etil asetat untuk menarik senyawa semi polar, sedangkan methanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Dari proses ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga (Mutiasari, 2012).

Metode yang umum digunakan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa yaitu metode kromatografi. Untuk tujuan kualitatif dapat digunakan kromatografi lapis tipis (KLT) sedangkan untuk pemisahan senyawa dalam jumlah besar dapat digunakan kromatografi lapis tipis (KLT) (Mutiasari, 2012).

3.7. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Frap (*ferric reducing antioxidant power*)

Metode ini dapat menentukan kandungan antioksidan total dari suatu bahan berdasarkan kemampuan mereduksi ion *Ferri-tripyridyl-triazine* (Fe^{3+}) menjadi *ferro-tripyridyl-triazine* (Fe^{2+}) sehingga kekuatan antioksidan suatu senyawa dianalogkan dengan kemampuan mereduksi dari senyawa tersebut (Halvorsen, *et al.*, 2002). Sebanyak 2 ml Ekstrak etil asetat berbagai konsentrasi (50, 100, 200, 400, 800 dan 1000 ppm) dalam etanol di tambah 2 ml buffer pospat 0,2 M, pH = 6,6 ditambahkan 2 ml $K_3Fe(CN)_6$ sebesar 1%, Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 2 ml trichloroacetic acid (TCA) 10% untuk menghentikan reaksi (apabila terjadi dua lapisan, dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit), lapisan atas diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan aquades, 0,5 ml $FeCl_3$ 0,1%. Campuran larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 5-10 menit. Serapan

larutan tersebut kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 539 nm. Peningkatan absorbansi sebagai indikator peningkatan daya mereduksi, Sebagai pembanding mereduksi sample digunakan Vitamin C.

1. Penyiapan reagen penelitian

A. Larutan Dapar Fosfat 0,2 M pH 6,6

Ditimbang 0,2 gram NaOH dan dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 25 ml dalam labu ukur, kemudian ditimbang KH₂PO₄ sebanyak 1,360 gram dan dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 50 ml dalam labu ukur. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 ml NaOH, dimasukkan dalam labu ukur dan dicampurkan 50 ml KH₂PO₄, selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan air bebas CO₂ hingga 200 ml.

B. Larutan Kalium Hexacyanoferrate (III) 1%

Ditimbang 1 gram kalium hexacyanoferrate (III) dan dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 100 ml dalam labu ukur.

C. Larutan FeCl₃ 0,1%

Ditimbang 0,1 gram FeCl₃ dan dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 100 ml dalam labu ukur.

D. Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10%

Ditimbang 10 gram TCA dan dilarutkan dengan air bebas CO₂ hingga 100 ml labu ukur.

E. Uji aktivitas antioksidan metode FRAP (*ferric reducing antioxidant power*)

1) Penentuan panjang gelombang maksimal

Sebanyak 2 ml Ekstrak etil asetat berbagai konsentrasi (50, 100, 200, 400, 800 dan 1000 ppm) dalam etanol di tambah 2 ml buffer pospat 0,2 M, pH = 6,6 ditambahkan 2 ml K₃Fe(CN)₆ sebesar 1%, Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 2 ml trichloroacetic acid (TCA) 10% untuk menghentikan reaksi (apabila terjadi dua lapisan, dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit), lapisan atas diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan aquades, 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Campuran larutan tersebut kemudian diinkubasi

pada suhu kamar (25°C) selama 5-10 menit. Serapan larutan tersebut kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 539 nm.

2) Pembuatan larutan vitamin C sebagai pembanding

Sebanyak 2 ml Vitamin C berbagai konsentrasi (50, 100, 200, 400, 800 dan 1000 ppm) dalam etanol di tambah 2 ml buffer pospat 0,2 M, pH = 6,6 ditambahkan 2 ml $K_3Fe(CN)_6$ sebesar 1%, Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 2 ml *trichloroacetic acid* (TCA) 10% untuk menghentikan reaksi (apabila terjadi dua lapisan, dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit), lapisan atas diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan aquades, 0,5 ml $FeCl_3$ 0,1%. Campuran larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 5-10 menit. Serapan larutan tersebut kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 539 nm.



