

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Pengambilan Sampel Tanaman Dan Determinasi

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) yang diperoleh dari Balitsa-Lembang, Jawa Barat. Determinasi telah dilakukan di Herbarium Jatinangor Laboratorium Taksonomi, Jurusan Biologi, Universitas Padjajaran.

4.2. Persiapan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) kemudian dicuci dengan air bersih yang mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan lalu memperkecil ukuran simplisia dengan cara di blender. Simplisia disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

4.3. Pemeriksaan Makroskopik Dan Mikroskopik

Pemeriksaan makroskopik meliputi pemeriksaan terhadap ukuran, bentuk, warna, dan karakteristik permukaan kacang hijau yang segar dan utuh. Pengukuran panjang dan lebar biji dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Pemeriksaan mikroskopik terhadap preparat kacang hijau diamati di bawah mikroskop menggunakan I₂KI, air, dan kloralhidrat.

4.4. Pengujian Parameter Standar Simplisia

Parameter standar simplisia yang diuji terdiri dari parameter non spesifik dan spesifik menurut Departemen Kesehatan (2000: 13). Pengujian parameter standar bertujuan untuk menetapkan kualitas simplisia. Parameter standar non spesifik meliputi kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, serta kadar air. Sedangkan parameter standar spesifik meliputi organoleptik, kadar sari larut air dan larut etanol.

4.4.1. Parameter Non Spesifik

1. Kadar Abu Total

Lebih kurang 2-3 gram zat yang telah digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara selama 15 menit pada suhu 600°C, diratakan, lalu dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis selama 8 jam di suhu yang sama, didinginkan dan ditimbang. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas dan disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukan ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara dapat dihitung (Depkes RI, 2000:17). Kadar abu total di hitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Abu total} = \frac{\text{Kadar Abu}}{\text{Bobot Simplisa Awal}} \times 100\%$$

2. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL asam klorida P selama 5 menit, dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam dihitung terhadap berat simplisia, dinyatakan dalam berat % b/b (Depkes RI, 1989:17). Kadar abu tidak larut asam dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam}}{\text{Bobot Simplisia Awal}} \times 100\%$$

3. Kadar Air

Pengujian kadar air menggunakan metode Azeotroph. Tabung penampung dan kondensor dibilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam oven. Dimasukkan 200 mL toluen yang telah djenuhkan dengan aquadest, masukkan sejumlah simplisia 25 gram yang dikira mengandung air 2-3 mL ke dalam labu bundar. Lalu didihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit (tambahkan serpihan batu didih). Setelah mendidih, suling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling. Naikkan kecepatan penyulingan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bilas bagian kondensor dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit, kemudian hentikan pemanasan. Dinginkan tabung penerima sampai suhu kamar, hilangkan tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima. Biarkan air dan toluen dalam tabung penerima memisah. Baca volume air dalam tabung penerima. Hitung kadar air dalam % dengan rumus : (Depkes R.I. 2000 :3)

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Volume air}}{\text{Bobot Simplisia Awal}} \times 100\%$$

4.4.2. Parameter Spesifik

1. Organoleptik

Dilakukan dengan menggunakan panca indra untuk menggambarkan bentuk, warna, bau, rasa dari biji kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) dengan responden sebanyak 5 orang (Depkes RI, 2000:31).

2. Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 gram bahan yang telah dikeringkan di udara, dimaserasi dengan 100 mL air-kloroform P (2,5 mL kloroform dalam 100 mL aquadest selama 24 jam, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring, 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:31). Kadar sari larut air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Sari Larut Air} = \frac{\text{Bobot Sari Larut Air}}{\text{Bobot Simplisa Awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

3. Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak 5 gram bahan yang telah dikeringkan di udara, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 96%, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring, 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar

sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000:32). Kadar sari larut etanol dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{\text{Bobot Sari Larut Etanol}}{\text{Bobot Simplisa Awal}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

4.5. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk menguji kandungan kimia yang terdapat pada simplisia yang terdiri dari penapisan alkaloid, polifenolat, tanin, flavonoid, monoterpen/sesquiterpen, steroid/triterpenoid, kuinon dan saponin.

4.5.1. Uji Alkaloid

Simplisia ditempatkan dalam mortar, ditambahkan beberapa tetes asam sulfat 2 N, dikocok dan disaring. Filtrat dibasakan dengan larutan ammonia 10 %. Kemudian ditambahkan kloroform didiamkan hingga terjadi pemisahan. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring dan ditambahkan asam klorida 2 N. lapisan asam dipipet dan dibagi tiga bagian: bagian 1 ditambahkan pereaksi Mayer, bagian 2 ditambahkan pereaksi Dragendorff, jika terbentuk endapan putih dengan pereaksi mayer atau adanya endapan jingga-kuning atau kekeruhan menandakan positif alkaloid. Bagian 3 digunakan sebagai blanko (Farnsworth, 1966:245).

4.5.2. Uji Polifenolat

Simplisia atau bahan uji ditempatkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Larutan pereaksi besi (III) klorida ditambahkan ke dalam filtrat dan timbulnya warna hijau atau biru

hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966:255).

4.5.3. Uji Tanin

Sejumlah kecil simplisia atau bahan uji lain ditempatkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, kemudian dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Larutan gelatin 1% ditambahkan ke dalam filtrat dan adanya endapan putih menandakan positif tanin (Farnsworth, 1966:255).

4.5.4. Uji Flavonoid

Simplisia atau bahan uji lain ditempatkan dalam tabung reaksi lalu dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida pekat 2 N, dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Amil alkohol ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok. Terjadinya warna jingga, merah muda sampai merah menandakan adanya senyawa flavonoid (Farnsworth, 1966:263).

4.5.5. Uji Monoterpenoid/Seskuiterpenoid

Simplisia atau bahan uji lain digerus dengan eter lalu dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan vanillin 10 % dalam asam sulfat pekat dan timbulnya warna-warna menandakan positif senyawa mono dan seskuiterpen (Depkes RI, 1997:132).

4.5.6. Uji Steroid/Triterpenoid

Simplisia atau bahan uji lain digerus dengan eter lalu dipipet sambil disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, lalu ditambahkan larutan pereaksi Liebermann Burchard dan terjadinya warna ungu

menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:256) .

4.5.7. Uji Kuinon

Sejumlah kecil simplisia atau bahan uji lain ditempatkan dalam tabung reaksi lalu dipanaskan di atas penangas air lalu disaring. Larutan kalium hidroksida 5 % ditambahkan kedalam filtrat dan timbulnya warna kuning hingga merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.5.8. Uji Saponin

Sejumlah kecil simplisia atau bahan uji lain ditempatkan dalam tabung reaksi lalu dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit, lalu setelah dingin dikocok kuat-kuat dan terjadinya busa setinggi ± 1 cm yang bertahan selama 5 menit menandakan positif saponin (Farnsworth, 1966:256).

4.6. Ekstraksi

Sampel ditimbang sebanyak 1000 gram yang telah diblender dan diekstrak dengan menggunakan etanol 96% dalam maserator, dibiarkan selama 24 jam dengan sesekali diaduk. Dilakukan pergantian pelarut tiap 24 jam selama 3 hari berturut-turut. Terhadap ekstrak cair dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian dilanjutkan pemekatan di atas *waterbath* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Setelahnya di peroleh ekstrak pekat, ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan alat corong pisah persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\text{Randemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot Ekstrak (g)}}{\text{Bobot Simplisia (g)}} \times 100 \%$$

4.7. Fraksinasi

Ekstrak etanol kental ditambahkan dengan aquadest (1:12), diaduk sampai homogen. Larutan ekstrak tersebut dimasukkan kedalam corong pisah yang kemudian difraksinasi menggunakan 3 pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat dan air. Ekstrak dilarutkan dalam aquadest, dimasukan ke dalam corong pisah lalu ditambah larutan n-heksana. Campuran dikocok hingga terpisah, kemudian sesekali keran dibuka untuk mengeluarkan udara, didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Selanjutnya fraksi n-heksana ditampung dan dipekatkan. Fraksi air yang terdapat di dalam corong difraksinasi dengan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama, sehingga diperoleh tiga fraksi yaitu fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air.

Fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, serta ekstrak etanol ditotolkan pada plat KLT silika gel dengan pengembang yang sesuai dengan kepolarannya dan penampang bercak lampu UV λ 254 nm. Plat KLT dimasukkan kedalam chamber lalu dielusi hingga senyawa pengembang bergerak mencapai batas maksimal eluen dan terbentuk bercak/spot. Bercak yang didapat tersebut diamati dan dihitung nilai Rf-nya (Harborne, 1987:14).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh bahan uji}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

4.8. Isolasi

Terhadap fraksi terpilih dilakukan fraksinasi kembali dengan metode kromatografi cair vakum (KCV). Terlebih dahulu fasa diam silika gel H₆₀ dimasukkan ke dalam kolom, kemudian kolom dikemas kering dalam keadaan vakum menggunakan alat vakum. Eluen yang kepolarannya rendah dimasukkan ke permukaan silika gel terlebih dahulu kemudian divakum kembali. Kolom dihisap sampai kering dengan alat vakum.

Fraksi terpilih ditambahkan silika, kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom yang telah berisi fasa diam dan kemudian dihisap secara perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan cara memvakumkannya. Setelah itu kolom dielusi gradien dengan fase gerak bervariasi (n-heksana, etil asetat, metanol). Kolom dihisap sampai kering pada setiap penambahan eluen. Kemudian fraksi-fraksi yang terbentuk dikumpulkan di dalam vial berdasarkan pola fraksinasi, lalu diuapkan pelarutnya. Kemudian dilakukan pemantauan pola kromatogram fraksi hasil tampungan tersebut dengan KLT menggunakan eluen yang sesuai. Kemudian dipilih fraksi yang kromatogramnya sesuai dengan senyawa yang akan di isolasi.

Fraksi yang didapat dimurnikan secara KLT preparatif dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (2:8) dan fasa diam silika gel GF₂₅₄. Kromatogram diamati dibawah sinar UV 366 mm, bagian yang berfluoresensi kuning dan biru dikerok, kemudian dilarutkan dalam metanol dan disaring. Filtrat yang dihasilkan diuapkan hingga diperoleh isolat.

4.9. Uji Kemurnian

Uji kemurnian isolat dilakukan menggunakan KLT pengembang tunggal dengan tiga komposisi eluen yang berbeda dan KLT dua dimensi. KLT pengembang tunggal dilakukan dengan menggunakan tiga komposisi eluen yang berbeda, yaitu yang bersifat non polar, semi polar, dan polar. Isolat murni ditandai dengan dihasilkan satu bercak. KLT dua dimensi dilakukan menggunakan dua komposisi eluen yang berbeda, yaitu yang bersifat kurang polar dan lebih polar. Pertama menggunakan eluen yang kurang polar lalu dibiarkan hingga naik, kemudian plat dimasukkan ke dalam chamber kedua yang berisi eluen yang lebih polar dengan memutar plat sebesar 90° . Hasil KLT diberi penampak bercak universal H_2SO_4 10%, isolat murni ditandai dengan dihasilkan satu bercak.

4.10. Identifikasi Secara Spektrofotometri UV-Sinar Tampak

Isolat diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Sinar tampak dengan cara melarutkan isolat ke dalam metanol pro analisis dan diukur spektrumnya.

Kemudian sampel dalam metanol ditambahkan dengan pereaksi geser. Tambahkan tiga tetes natrium hidroksida(NaOH) ke dalam kuvet (1 mL, volume 2 mL). Campur lalu rekamlah spektrum natrium hidroksida(NaOH). Untuk memeriksa apakah ada penguraian, spektrum natrium hidroksi(NaOH) direkam lagi setelah kira-kira lima menit. Kemudian, isolat dibuang dan sel (kuvet) yang telah dicuci diisi lagi dengan larutan isolat persediaan. Enam tetes pereaksi aluminium klorida($AlCl_3$) ditambahkan ke dalam larutan isolat, campur, lalu ukur spektrum aluminium

klorida(AlCl_3). Selanjutnya ditambahkan tiga tetes asam klorida(HCl), campur dan ukur spektrum AlCl_3/HCl . Akhirnya, sampel dibuang dan sel dicuci. Kemudian tambahkan serbuk natrium asetat(NaOAc) ke dalam larutan isolat persediaan dalam kuvet sedemikian rupa sehingga terdapat kira-kira 2 mm lapisan natrium asetat(NaOAc) pada dasar kuvet. Campuran harus dikocok baik-baik sebelum spektrum natrium asetat(NaOAc) diukur. Pada tahap ini dapat diperiksa apakah sampel terurai dengan berjalannya waktu. Lalu spektrum $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ diukur setelah ditambahkan asam borat(H_3BO_3) dan dicampur (banyaknya asam borat(H_3BO_3), kira-kira setengah dari natrium asetat(NaOAc) (Markham, 1981:42).

