

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini meliputi beberapa tahapan yaitu pengumpulan dan pengolahan bahan, karakterisasi bahan, pembuatan ekstrak, fraksinasi, pemantauan fraksi, isolasi, dan karakterisasi isolat. Bahan penelitian yang digunakan adalah kacang hijau (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek).

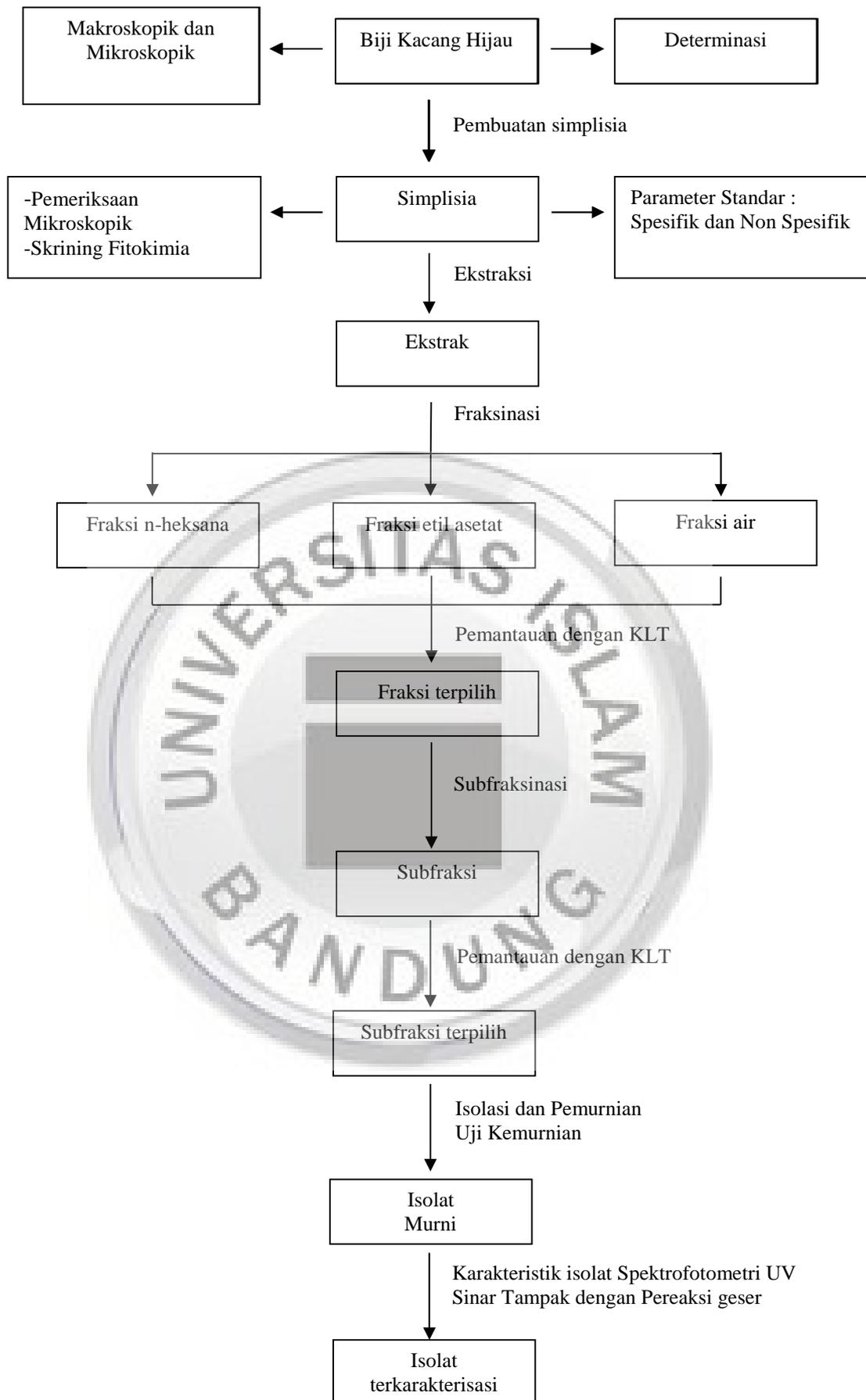
Bahan atau sampel diperoleh dari Balitsa-Lembang, Jawa Barat. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Jatinangor Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Universitas Padjajaran.

Penyiapan simplisia dibuat dari kacang hijau yang telah dikumpulkan, kemudian dilanjutkan dengan sortasi kering, pencucian, pengeringan dengan cara diangin-anginkan, dan pengecilan ukuran simplisia dengan cara diblender. Karakterisasi simplisia terdiri dari pengujian parameter standar (berupa kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, dan kadar air) dan penapisan fitokimia (meliputi golongan alkaloid, tanin, flavonoid, polifenolat, monoterpen/seskuiterpen, steroid/triterpenoid, kuinon, dan saponin).

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96 % (dilakukan remaserasi selama 3x24jam). Ekstrak etanol yang diperoleh, dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan dilanjutkan dengan penangas air (*water bath*) untuk menghilangkan sisa pelarut yang masih terdapat dalam ekstrak, sehingga diperoleh ekstrak kental.

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan tiga pelarut dengan kepolaran yang berbeda, yaitu n-heksana, etil asetat dan air. Fraksi yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Selanjutnya dilakukan pemantauan ekstrak dan fraksi secara KLT menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (2:8), fase diam yang digunakan silika GF₂₅₄ dengan penampak bercak lampu UV λ 254 nm dan 366 nm.

Terhadap fraksi terpilih dilakukan pemisahan lanjutan dengan metode kromatografi cair vakum. Fraksi hasil kromatografi cair vakum yang memiliki bercak yang berfluoresensi diisolasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (2:8). Isolat yang diperoleh kemudian dilakukan uji kemurnian dengan metode KLT. Terhadap isolat murni diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Sinar Tampak dengan menggunakan beberapa pereksi geser. Skema penelitian dapat dilihat pada **Gambar II.1**.



Gambar II.1. Diagram Alir Penelitian