

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

Metodologi yang dilakukan pada penelitian ini meliputi persiapan bahan uji, determinasi tanaman, pengamatan makroskopik dan mikroskopik, preparasi simplisia, penapisan fitokimia, penetapan parameter standar, ekstraksi, fraksinasi, pemantauan ekstrak dan fraksi secara kualitatif menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan pembanding β -sitosterol dan karakterisasi senyawa β -sitosterol menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Penyiapan bahan uji diperoleh dengan mengumpulkan tanaman buncis berupa daun buncis (*Phaseolus vulgaris L*) dari perkebunan Balai Penelitian Tanaman Sayuran (BALITSA) Lembang – Bandung, Jawa Barat. Setelah bahan uji didapat, selanjutnya dilakukan determinasi di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjajaran. Tahapan ini dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas dari tanaman yang akan diteliti agar menjamin keberadaan senyawa kimia yang diharapkan.

Pengamatan makroskopik dan mikroskopik dilakukan pada daun buncis (*Phaseolus vulgaris L*) yang masih segar. Pengamatan makroskopik meliputi pemeriksaan fisik tumbuhan berupa bentuk dan warna. Sedangkan pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap sayatan melintang daun buncis (*Phaseolus vulgaris L*) untuk melihat keberadaan jaringan-jaringan yang dimiliki tanaman ini.

Preparasi sampel daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L) diawali dengan sortasi basah, lalu dilakukan pencucian dengan air mengalir, ditiriskan, selanjutnya dilakukan perajangan.

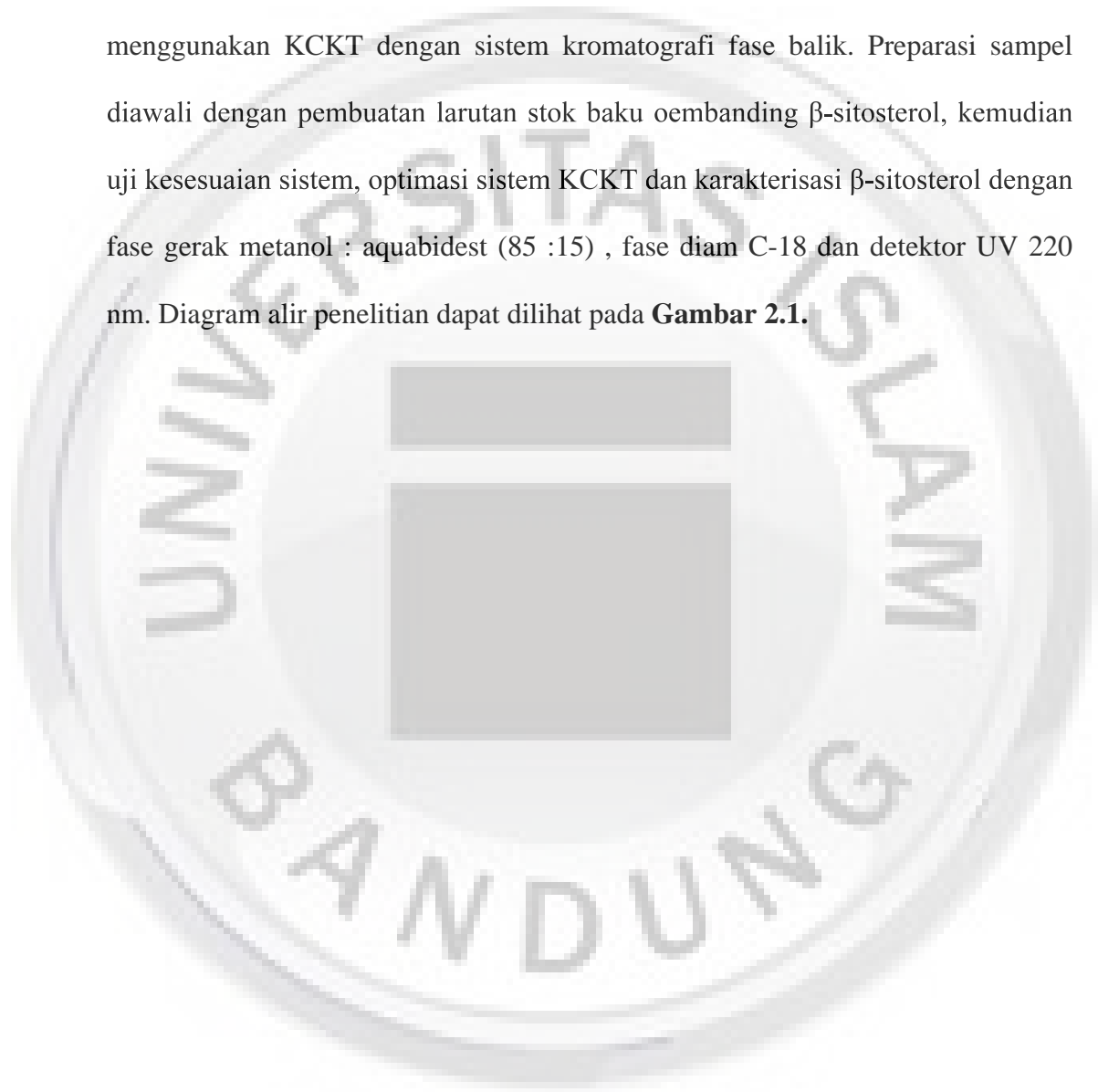
Pengukuran parameter standar yang dilakukan pada simplisia meliputi kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Sedangkan pada ekstrak dilakukan pengujian parameter berupa uji organoleptik dan pengukuran bobot jenis.

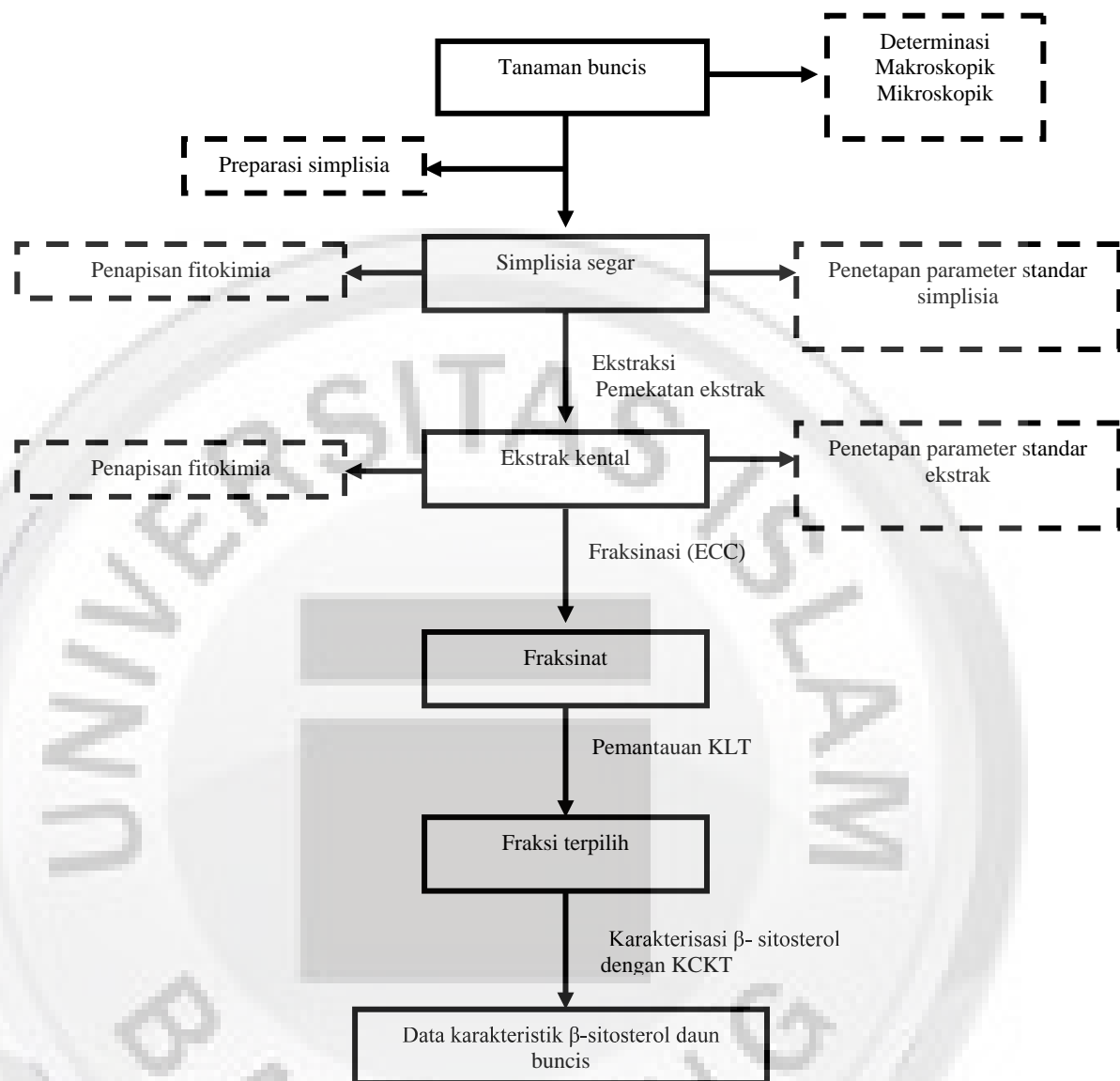
Penapisan fitokimia merupakan langkah pertama dalam melakukan identifikasi kandungan kimia pada tanaman yang dijadikan bahan uji. Tahap ini berperan penting dalam menentukan golongan senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman yang dijadikan bahan uji. Pengujian yang dilakukan pada simplisia segar daun buncis (*Phaseolus vulgaris* L), meliputi uji flavonoid, alkaloid, polifenol dan tanin, kuinon dan saponin, monoterpen seskuiterpen, steroid triterpenoid.

Adapun metode ekstraksi yang akan digunakan terhadap bahan uji adalah maserasi dengan pelarut etanol 95%. Terhadap ekstrak dilakukan pemekatan ekstrak dengan *rotary vacuum evaporator* dan pemantauan ekstrak menggunakan metode kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa β -sitosterol. Ekstrak kental etanol selanjutnya difraksinasi menggunakan ekstraksi cair-cair dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 70%. Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian dipantau lagi dengan menggunakan KLT dengan senyawa pembanding β -sitosterol. Pengamatan bercak senyawa dilakukan dengan

menggunakan lampu UV 254, serta penampak bercak spesifik untuk steroid yaitu LB

Terhadap fraksi terpilih dilakukan karakterisasi senyawa β -sitosterol menggunakan KCKT dengan sistem kromatografi fase balik. Preparasi sampel diawali dengan pembuatan larutan stok baku oembanding β -sitosterol, kemudian uji kesesuaian sistem, optimasi sistem KCKT dan karakterisasi β -sitosterol dengan fase gerak metanol : aquabidest (85 :15) , fase diam C-18 dan detektor UV 220 nm. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada **Gambar 2.1.**





Gambar 2.1 Diagram alir penelitian