

**BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM**  
**FITOKIMIA**

**Edisi Revisi X**



**Disusun oleh :**

**Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt.**  
**Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.**  
**Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt.**  
**Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt.**

**BAGIAN BIOLOGI FARMASI**  
**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS JEMBER**  
**2016**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT. Atas berkat dan rahmat-Nya penulisan buku petunjuk praktikum fitokimia ini dapat kami selesaikan. Praktikum fitokimia bertujuan untuk memberikan pemahaman dan ketrampilan kepada mahasiswa tentang prosedur untuk mendapatkan metabolit sekunder.

Materi-materi pada praktikum ini meliputi skrining fitokimia, ekstraksi, fraksinasi dan isolasi zat aktif dari tanaman obat. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan kimia dari suatu tanaman obat. Identifikasi dilakukan dengan reaksi warna, pengendapan dan kromatografi lapis tipis. Pada ekstraksi digunakan metode maserasi dan perkolasi. Isolasi dilakukan dengan fraksinasi dengan kromatografi kolom dan kristalisasi langsung zat aktif dari ekstraknya.

Akhirnya, kami menyadari bahwa buku ini masih jauh dari sempurna. Saran dan kritik yang membangun dari sejawat Farmasis yang bergerak di bidang ilmu bahan alam dan ilmu lain yang terkait sangat kami harapkan untuk kesempurnaan buku ini.

Jember, September 2014

Penyusun

## DAFTAR ISI

Kata Pengantar.....	i
Daftar Isi.....	ii
Tata tertib .....	iii
Alat-alat yang digunakan dalam praktikum.....	1
Zat-zat kimia yang digunakan dalam praktikum .....	5
Ekstraksi.....	7
Metode skrining .....	10
Separasi .....	12
BAB I Skrining Fitokimia.....	15
BAB II Ekstraksi .....	17
BAB III Fraksinasi dengan Kromatografi kolom .....	25
BAB IV Isolasi.....	28
Daftar Pustaka.....	34

**TATA TERTIB  
PRAKTIKUM FITOKIMIA**

1. Mahasiswa harus masuk laboratorium tepat waktu sesuai dengan jadwal masing-masing. Keterlambatan ditolerir dengan alasan yang kuat.
2. Mahasiswa saat memasuki ruang laboratorium harus sudah siap dengan jas praktikum, buku petunjuk praktikum, buku kerja, alat tulis dan alat-alat lain yang digunakan untuk praktikum.
3. Sebelum praktikum akan dilaksanakan pretest dan diskusi untuk menguji kesiapan mahasiswa dalam mengikuti praktikum.
4. Setiap kali selesai mengerjakan satu materi praktikum, mahasiswa diharuskan membuat laporan sementara dan meminta persetujuan (acc) dari dosen atau asisten mahasiswa yang bertugas.
5. Mahasiswa yang merusakkan, memecahkan atau menghilangkan peralatan praktikum harus melapor kepada dosen jaga atau tehniisi laboratorium dan diwajibkan mengganti dengan kualitas yang sama.
6. Setiap mahasiswa harus membuat laporan praktikum yang dikumpulkan kepada pembimbing praktikum masing-masing paling lambat seminggu setelah praktikum yang bersangkutan selesai dikerjakan.
7. Mahasiswa diwajibkan menjaga kebersihan dan kerapian meja praktikum serta botol-botol pereaksi.
8. Nilai praktikum terdiri dari:

Nilai pretest	: 20 %
Nilai laporan dan diskusi	: 30 %
Nilai ujian praktikum	: 50 %

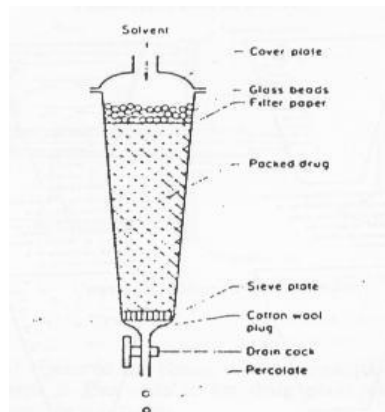
Jember, September 2014

Tim Pembina Praktikum Fitokimia

## ALAT-ALAT YANG DIGUNAKAN PADA PRAKTIKUM FITOKIMIA

### 1. Perkolator

Perkolator adalah alat yang digunakan untuk mengekstraksi serbuk simplisia dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk yang telah dibasahi dengan cairan penyari terlebih dahulu.



Gambar 1. Perkolator

### 2. Penguap Putar (Rotary evaporator)

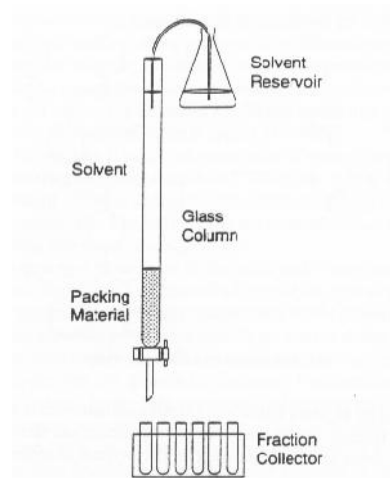
Penguap putar digunakan untuk memisahkan atau menguapkan cairan penyari dari bahan yang disari sehingga didapatkan sari (ekstrak) pekat. Dengan alat ini proses penguapan cairan penyari terjadi melalui penurunan titik didihnya dengan menurunkan tekanannya. Gambar dapat dilihat dibawah ini.



Gambar 2.penguap putar

### 3. Kolom Kromatografi

Alat ini digunakan untuk memisahkan zat aktif dari komponen-komponen lainnya dengan menggunakan prinsip kromatografi yaitu pemisahan campuran komponen berdasarkan pada perbedaan migrasi komponen-komponen tersebut dari fase diam oleh pengaruh fase gerak. Kolom berupa tabung kaca dengan diameter tertentu yang bagian bawahnya memiliki lubang pengalir. Gambar beserta bagian-bagiannya dapat dilihat pada gambar dibawah ini (Markham,1982)



Gambar 3. Kolom kromatografi

### 4. Penotol mikro

Alat ini digunakan untuk menotolkan sejumlah tertentu ekstrak pada lempeng KLT. Ukuran ada beberapa macam seperti 1  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , dan 5  $\mu\text{L}$ .

### 5. Pipet tetes

Pipet tetes yang dipakai biasanya kecil. Pipet tetes berguna untuk memindahkan air / zat-zat kimia dari botol ke atas papan tetes atau ke dalam tabung.

### 6. Papan Tetes

Papan yang digunakan untuk mencampur ekstrak dengan pereaksi pada skrining fitokimia.

### 7. Lampu Ultra Lembayung

Alat ini digunakan untuk melihat kromatogram pada KLT. Noda akan nampak berupa pendar atau mematikan pendar flour apabila dikenai sinar ultra lembayung (UV-light) pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 254 atau 360 nm.

**8. Vial**

Vial digunakan untuk menampung hasil ekstraksi pada separasi dengan kromatografi kolom.

**9. Lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Lempeng KLT yang digunakan untuk praktikum adalah lempeng KLT aluminium yang berbentuk bujur sangkar, berukuran: 200 X 200 mm. Lempeng KLT terbuat dari silika gel dengan ukuran tertentu dan dilapiskan pada sebuah lempengan aluminium. Lempeng ini digunakan untuk memisahkan zat-zat kimia yang akan diidentifikasi dengan prinsip pemisahan kromatografi.

**10. Bejana Kromatografi**

Bejana kromatografi digunakan sebagai tempat mengeluasi lempeng KLT. Bejana KLT terbuat dari kaca pejal yang tidak memiliki sambungan di sudut-sudutnya. Bejana memiliki tutup yang terbuat dari kaca atau logam tahan korosi. Bejana harus dapat menampung lempeng 200X200 mm dan tertutup rapat.

**11. Kertas saring**

Kertas saring digunakan untuk melihat kejenuhan bejana kromatografi

**12. Pinset**

Pinset digunakan untuk memasukkan dan mengeluarkan lempeng KLT dari bejana kromatografi

**13. Tabung reaksi**

Tabung reaksi digunakan sebagai tempat mereaksikan ekstrak tumbuhan dengan pereaksi (reagen) pada skrining fitokimia.

**14. Seperangkat alat gelas**

Beaker glas, erlenmeyer, dsb

**15. Alat penyemprot Lempeng KLT**

Alat ini digunakan untuk menyemprotkan penampak noda pada lempeng KLT.

**16. Destilasi stahl****17. Soxhlet**



## ZAT-ZAT KIMIA YANG DIGUNAKAN DALAM PRAKTIKUM FITOKIMIA

Beberapa zat kimia yang digunakan dalam praktikum fitokimia, diantaranya:

1. **Metanol, Etanol, Etil Asetat, Kloroform, Air, Heksana, Butanol, Toluena**  
Pelarut ini digunakan pelarut pengestraksi, atau dapat juga digunakan sebagai komponen penyusun fase gerak pada KLT.
2. **Asam Klorida (HCl)**  
Asam klorida digunakan untuk menetralkan basa, memberikan suasana asam ataupun untuk menghidrolisis. Asam klorida yang digunakan untuk praktikum ini HCl 2 N dan HCl pekat.
3. **Pereaksi Wagner**  
Pereaksi Wagner digunakan untuk mengendapkan dan mendeteksi alkaloid. Pereaksi ini dibuat dengan cara melarutkan 1,27 g I<sub>2</sub> dan 2g KI dalam air hingga diperoleh volume 100 mL.
4. **Pereaksi Mayer**  
Pereaksi ini dapat mengendapkan alkaloid. Pereaksi Mayer dibuat dengan cara mencampurkan 60 mL HgCl<sub>2</sub> 2,266 % b/v dengan 10 mL larutan KI 50% b/v, kemudian ditambah air hingga volume 100 mL. Dengan pereaksi ini akan terjadi endapan putih.
5. **NH<sub>4</sub>OH (Ammoniak)**  
Uap amoniak murni digunakan sebagai penampak noda pada identifikasi flavonoid dengan KLT. Sedangkan larutan amoniak encer digunakan untuk memberikan suasana basa pada suatu sampel.
6. **Dragendorf**  
Larutan dragendorf dibuat dengan cara mencampurkan 20 mL Bismut nitrat 40% b/v dalam HNO<sub>3</sub> p dengan 50 mL KI 54,4 % b/v. Campuran ini kemudian didiamkan sampai memisah sempurna, selanjutnya diambil cairan yang berwarna jernih dan diencerkan dengan air hingga volume 100 mL. Pereaksi ini digunakan sebagai penampak noda pada identifikasi alkaloid dengan KLT, terjadi bercak coklat /merah coklat.



**7. Asam asetat anhidrat**

Larutan  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  murni pereaksi, mengandung tidak kurang 95,0%  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ .

**8. Anisaldehyd sulfat**

Larutan segar yang diperoleh dengan mencampurkan 0,5 mL Anisaldehyd dalam 50 mL asam asetat glasial dan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Larutan ini digunakan untuk mendeteksi adanya terpenoid, steroid, dan minyak atsiri. Pereaksi ini tidak tahan lama, jangan digunakan jika telah berubah warna menjadi merah jingga. Setelah disemprotkan pada lempeng KLT, panaskan di oven pada suhu  $100\text{ }^\circ\text{C}$  selama 5 -10 menit.

**9. Antimon Klorida**

Pereaksi ini digunakan sebagai penampak noda pada identifikasi terpenoid dan steroid yang dibuat dengan cara melarutkan 20 g antimon klorida dalam kloroform atau etanol hingga volume 100 mL. Pengamatan noda dilakukan setelah lempeng disemprot dan dipanaskan 5-6 menit pada suhu  $110\text{ }^\circ\text{C}$

**10.  $\text{FeCl}_3$** 

Larutan Feri klorida merupakan larutan 10 %  $\text{FeCl}_3$  dalam air. Larutan ini digunakan sebagai penampak noda untuk senyawa golongan polifenol, akan terjadi warna ungu tua atau biru tua.

**11. KOH**

Kalium hidroksida encer (5N) digunakan sebagai pemberi suasana basa sedangkan KOH 10 % digunakan sebagai penampak noda pada identifikasi senyawa golongan antrakinin.

# EKSTRAKSI

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan, dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang ditetapkan .

Proses ekstraksi bahan atau bahan obat alami dapat dilakukan berdasarkan teori tentang penyarian. Penyarian merupakan peristiwa pemindahan masa. Zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi larutan zat aktif dalam cairan penyari tersebut.

Ada tiga macam metoda penyarian yang dapat digunakan, yaitu:

## 1. Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel.

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, stirak dan bahan sejenis yang mudah mengembang.

Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol atau pelarut lain. Bila cairan penyari digunakan air maka untuk mencegah timbulnya kapang, dapat ditambahkan bahan pengawet, yang diberikan pada awal penyarian.

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan.

Sedangkan kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna.

Maserasi dapat dimodifikasi menjadi beberapa metode yaitu:

a. Digesti.

Digesti adalah cara maserasi dengan menggunakan pemanasan lemah, yaitu pada suhu 40-50 °C. Cara maserasi ini hanya dapat dilakukan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan.

b. Maserasi dengan mesin pengaduk

Penggunaan mesin pengaduk berputar terus-menerus, waktu proses maserasi dapat dipersingkat 6-24 jam.

c. Remaserasi

Cairan penyari dibagi 2. seluruh serbuk simplisia dimaserasi dengan cairan penyari pertama, sesudah diempur dan diperas, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari yang kedua.

d. Maserasi melingkar

Maserasi dapat diperbaiki dengan mengusahakan agar cairan penyari selalu bergerak dan menyebar. Dengan cara ini penyari selalu mengalir kembali secara berkesinambungan melalui serbuk simplisia dan melarutkan zat aktifnya.

## 2. Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Cara perkolasi lebih baik dibandingkan cara maserasi karena:

a. Aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan yang terjadi dengan larutan yang konsentrasinya lebih rendah sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi.

b. Ruangan diantara serbuk-serbuk simplisia membentuk saluran tempat mengalir cairan penyari. Karena kecilnya saluran kapiler tersebut, maka kecepatan pelarut cukup untuk mengurangi lapisan batas, sehingga dapat meningkatkan perbedaan konsentrasi.

Prinsip perkolasi adalah sebagai berikut:

Serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang

dilalui sampai mencapai keadaan jenuh. Gerak kebawah disebabkan oleh kekuatan gaya beratnya sendiri dan cairan diatasnya, dikurangi dengan daya kapiler yang cenderung untuk menahan. Kekuatan yang berperan dalam perkolasi antara lain gaya berat, kekentalan, daya larut, tegangan permukaan, difusi, osmosa, adhesi, daya kapiler, dan daya geseran (friksi).

### **3. Ekstraksi dengan menggunakan Soxhlet**

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

### **4. Ekstraksi dengan menggunakan gas superkritis**

Ekstraksi ini menggunakan gas superkritis seperti CO<sub>2</sub>, Metode ini sekarang sering digunakan karena efisiensinya lebih baik dibandingkan berbagai metode lainnya. Kelemahan dari metode ini peralatan yang cukup rumit dan mahal.

# METODE PANAPISAN

Berbagai macam pendekatan dilakukan untuk mendapatkan produk bahan alam (*natural product*), dalam hal ini obat dari bahan alam yang memiliki aktivitas biologis. Tujuan utama dari pencarian ini adalah untuk mendapatkan tanaman yang akan dikaji kandungan kimianya secara lebih mendalam. Pada dasarnya ada 2 metode untuk mendapatkan zat aktif secara biologis dalam suatu tanaman yaitu dengan mencari zat aktif (senyawanya) ataupun dengan mencari efek biologis yang ditimbulkan oleh tumbuhan tersebut.

## 1. Panapisan Fitokimia (Phytochemical Screening)

Penapisan fitokimia dilakukan apabila ekstrak dari tumbuhan yang kita peroleh belum diketahui kandungan kimianya. Penapisan fitokimia ditujukan untuk mengetahui kandungan senyawa / golongan senyawa dalam suatu tanaman atau ekstrak tanaman.

Langkah pertama dalam melakukan penapisan fitokimia adalah pembuatan ekstrak kemudian dilakukan penelitian golongan kandungan dengan cara reaksi warna, reaksi endapan atau dengan kromatografi lapis tipis. Pada proses ekstraksi digunakan pelarut yang dapat melarutkan semua zat yang ada dalam tumbuhan tersebut, yaitu etanol atau metanol 80%.

Pada umumnya golongan senyawa yang akan diperiksa adalah: (1) alkaloid, (2) glikosida saponin, triterpenoid, dan steroid, (3) glikosida jantung (4) flavonoid, (5) tanin dan senyawa polifenol, dan (6) antrakinon.

## 2. Penapisan Farmakologi/Biologi (Pharmacological/Biological Screening)

Penapisan ini dilakukan dengan cara menguji aktivitas farmakologi/biologi berbagai macam ekstrak tanaman. Tumbuhan yang akan diuji efek farmakologinya bisa berupa tanaman yang dikumpulkan secara acak (*random screening*) atau kelompok tanaman terpilih misalnya tanaman obat yang biasa digunakan pada daerah atau etnis tertentu.

Metode pengujian yang digunakan biasanya sederhana dengan menggunakan larva udang laut, kultur sel atau organ atau hewan coba tikus, ataupun mencit. Efek

farmakologi yang diujikan diantaranya antiinflamasi, analgetik, antikanker, antibakteri, antifungi, antifertilitas, diuretik, antidiabetes dan sebagainya. Hasil dari metode ini dijadikan sebagai alat untuk mengisolasi zat aktif (kumpulan senyawa) yang terkandung dalam ekstrak tumbuhan.

### **3. Penapisan Etnofarmakologi**

Metode penapisan ini didasarkan pada pengetahuan tradisional masyarakat di suatu daerah atau budaya tertentu. Metode ini melibatkan berbagai macam disiplin ilmu seperti antropologi, ethnobotani, botani, fitokimia, dan farmakologi.

Data-data kumpulan tumbuhan dari studi ini selanjutnya diuji efek farmakologinya dan dilanjutkan dengan isolasi bahan aktif, uji toksisitas, modifikasi struktur dan uji klinik sehingga menjadi farmakoterapi (*pharmacotherapy*). Ataupun dengan formulasi ekstrak yang kemudian diuji toksisitasnya, distandarisasi dan diuji secara klinik sehingga menjadi fitoterapi (*phytotherapy*).

# TEKNIK SEPARASI

Untuk mendapatkan isolat murni dari ekstrak suatu tumbuhan perlu dilakukan pemisahan dan pemurnian, karena ekstrak mengandung berbagai komponen. Pemisahan atau separasi adalah suatu langkah operasional untuk memisahkan komponen yang dituju dari komponen-komponen lainnya. Ada beberapa metode separasi yaitu ekstraksi (*solvent extraction*), destilasi, kristalisasi, dan kromatografi.

## 1. Ekstraksi (*solvent extraction*)

Pemisahan dengan menggunakan 2 pelarut yang tidak saling campur. Prinsip pada pemisahan ini didasarkan pada perbedaan kelarutan komponen yang akan diambil terhadap 2 pelarut tersebut (koefisien distribusi). Pemisahan dilakukan dengan menggunakan corong pisah, digojog dan didiamkan. Kekuatan dan lama penggojogan sangat berpengaruh terhadap hasil.

## 2. Destilasi

Pada pemisahan dengan cara destilasi dilakukan berdasarkan perbedaan titik didih dari komponen-komponen yang akan dipisahkan. Campuran komponen yang akan dipisahkan diletakkan pada sebuah labu destilasi dan dipanaskan hingga menguap, dengan adanya pendingin komponen-komponen tersebut akan mengembun dan terpisah dari campurannya.

## 3. Kristalisasi

Kristalisasi dilakukan apabila komponen yang kita tuju dapat dikristalkan sedangkan komponen pengotor lainnya tidak mengkristal. Cara ini cukup sederhana dilakukan dengan cara melarutkan campuran komponen pada pelarut yang sesuai kemudian didinginkan hingga terbentuk kristal, kristal kemudian dipisahkan dari campuran tersebut.

## 4. Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan fisik campuran komponen dalam suatu sampel (ekstrak) berdasarkan pada perbedaan migrasi komponen-komponen tersebut dari fase diam oleh pengaruh fase gerak.

Beberapa macam kromatografi yang sering digunakan di laboratorium fitokimia untuk pemisahan adalah:

### 1. Kromatografi kolom konvensional

Beberapa langkah atau tahap untuk melakukan kromatografi kolom adalah sebagai berikut:

- a. Fase diam seperti silika gel, kieselguhr, aluminium oksida yang telah diaktifkan dalam keadaan kering atau telah dicampur dengan sejumlah cairan, dimampatkan ke dalam tabung kaca dengan diameter tertentu yang bagian bawahnya memiliki lubang pengalir.
- b. Sejumlah campuran atau ekstrak yang akan dipisahkan (maksimal 1% dari jumlah fase diam) dilarutkan pada sedikit pelarut, dikeringkan dengan fase diam dan diletakkan pada bagian atas kolom. Selanjutnya dialiri dengan pelarut pengembang terpilih (diperoleh dari hasil orientasi menggunakan kromatografi lapis tipis) dengan atau tanpa tekanan udara. Masing-masing komponen dalam campuran akan bergerak turun dengan kecepatan yang khas sehingga terjadi pemisahan dalam kolom. Kecepatan pergerakan dari komponen dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti daya serap fase diam, sifat pelarut pengembang (fase gerak), suhu, sifat zat, dan sebagainya. Jika dikehendaki, pemisahan dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut pengembang yang berbeda-beda (*gradient elution*).
- c. Selama proses pengaliran, kran pengalir dialirkan dengan kecepatan alir tertentu. Pelarut pengembang yang keluar ditampung dalam wadah dengan volume tertentu (1 mL, 5 mL, dsb)
- d. Hasil tampungan kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Tampungan yang memiliki harga  $R_f$  yang sama dikumpulkan.

### 2. Kromatografi Kertas

Pada kromatografi kertas fase diam yang digunakan sehelai kertas dengan susunan serabut dan tebal yang cocok. Pemisahan dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut pengembang terpilih. Tahapan pemisahan dengan kromatografi kertas adalah sebagai berikut.

- a. Sehelai kertas yang akan digunakan sebagai fase diam diberi batas tepi dan sampung.
- b. Ekstrak yang akan dipisahkan dilarutkan dalam sedikit pelarut dan ditotolkan pada kertas dengan penotol mikro. Penotolan dilakukan sehingga membentuk sebuah gasir (pita) sepanjang kertas. Sebaiknya selama penotolan, hasil totolan dikeringkan dengan *hair dryer* untuk menghindari rusaknya kertas.
- c. Setelah semua ekstrak tertotolkan, kertas kromatografi diletakkan dalam sebuah bak kromatografi (*chamber*) yang telah diisi dengan pelarut



pengembang terpilih. Arah eluasi bisa dilakukan menurun apabila pelarut pengembang dibiarkan merambat turun pada kertas kromatografi. Dan bisa juga menaik apabila kertas dicelupkan ke dalam pelarut pengembang dan akan bergerak merambat keatas.

- d. Setelah pelarut pengembang sampai pada batas eluasi, kertas kromatografi diambil dari bak kromatografi dan dikeringkan dengan diangin-anginkan. Noda atau bercak yang ada kemudian dipotong dan diekstraksi dengan pelarut yang sesuai.
  - e. Letak noda dapat ditetapkan dengan cara: (1) pengamatan langsung dengan menggunakan lampu UV atau dengan sinar biasa bila noda berwarna, (2) dengan diberi pereaksi yang reversibel sehingga tidak merusak zat yang akan diambil, dan (3) bila zat nampak dengan pereaksi yang *irreversibel*, maka bagian yang disemprot hanya pada bagian tepi kiri dan kanan kertas kromatografi sedang bagian tengah dilindungi dengan aluminium foil.
3. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran komponen dengan menggunakan fase diam serbuk halus (seperti silika gel, kieselguhr, aluminium oksida aktif), yang dilapiskan dengan ketebalan tertentu secara merata diatas lempeng kaca. Tahapan pemisahan dengan KLT preparatif sama dengan tahapan pada pemisahan dengan kromatografi kertas.
  4. HPLC preparatif

Prinsip pemisahan dengan teknik ini sama dengan penggunaan pada HPLC analitik. Yang membedakan hanya pada penggunaan kolom yang lebih besar dan injektor yang lebih banyak.

# BAB I

## SKRINING FITOKIMIA

### LATIHAN I

#### PEMBUATAN EKSTRAK UNTUK SKRINING FITOKIMIA

##### Tujuan

Mahasiswa mengetahui cara pembuatan ekstrak untuk skrining fitokimia

##### Bahan :

Simplisia "X"

##### Cara Kerja :

1. Sebanyak 500 gram serbuk kering dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah dilengkapi dengan pengaduk magnetik (*magnetic stirrer*).
2. Pada serbuk tersebut kemudian ditambahkan etanol atau metanol 80% sebanyak 4,5x bobot serbuk.
3. Serbuk yang telah terbasahi dengan pelarut, dipanaskan selama 2 jam pada suhu 50–60 °C dengan pengadukan diatas lempeng pemanas berpengaduk (*hot plate stirrer*).
4. Setelah itu filtrat dipisahkan dari ampas dengan penyaringan. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan penguap putar (*rotary evaporator*) atau dipanaskan diatas penangas air sehingga diperoleh ekstrak kental yang siap digunakan untuk penapisan fitokimia.

**LATIHAN II**  
**IDENTIFIKASI SENYAWA GOL. ALKALOID**

**Tujuan :**

Mahasiswa mengetahui cara identifikasi senyawa golongan alkaloid

**Bahan :**

Ekstrak simplisia "X"

**Cara Kerja :****1. Penyiapan Sampel**

Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditambah 5 ml HCl 2 N, dipanaskan di atas penangas air selama 2-3 menit, sambil diaduk. Setelah dingin ditambah 0,3 gram NaCl, diaduk rata kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 5 ml HCl 2 N dan dibagi menjadi tiga bagian yang disebut sebagai larutan IA, IB dan IC.

**2. Reaksi Pengendapan**

Larutan IA ditambah pereaksi Mayer, larutan IB ditambah dengan pereaksi Wagner dan larutan IC dipakai sebagai blanko.  
Adanya kekeruhan atau endapan menunjukkan adanya alkaloid.

**3. Kromatografi Lapis Tipis**

Larutan IC ditambah  $\text{NH}_4\text{OH}$  28% sampai larutan menjadi basa, kemudian diekstraksi dengan 5 ml kloroform bebas air, lalu disaring. Filtrat diuapkan sampai kering, kemudian dilarutkan dalam metanol dan siap untuk pemeriksaan dengan KLT.

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : Etil asetat – metanol – air (9 : 2 : 2 )

Penampak noda : Pereaksi Dragendorf

Jika timbul warna jingga menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak.

### LATIHAN III

#### IDENTIFIKASI GLIKOSIDA SAPONIN, TRITERPENOID DAN STEROID

**Tujuan :**

Mahasiswa mengetahui cara identifikasi senyawa golongan glikosida saponin, triterpenoid, dan steroid

**Bahan :**

Ekstrak simplisia "X"

**Cara Kerja :****1. Uji Buih**

Ekstrak sebanyak 0,3 gram dimasukkan tabung reaksi, kemudian ditambah air suling 10 ml, dikocok kuat-kuat selama kira-kira 30 detik. Tes buih positif mengandung saponin bila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan.

**2. Reaksi Warna**

0,3 gram ekstrak dilarutkan dalam 15 ml etanol, lalu dibagi menjadi tiga bagian masing-masing 5 ml, disebut sebagai larutan IIA, IIB, dan IIC

**a. Uji Liebermann-Burchard**

Larutan IIA digunakan sebagai blanko, larutan IIB sebanyak 5 ml ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes  $H_2SO_4$  pekat, lalu dikocok perlahan dan diamati terjadinya perubahan warna. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya saponin steroid, warna merah ungu menunjukkan adanya triterpen steroid dan warna kuning muda menunjukkan adanya saponin jenuh.

**b. Uji Salkowski**

Larutan IIA digunakan sebagai blanko, larutan IIC sebanyak 5 ml ditambah 1 – 2 ml  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cincin berwarna merah.

### 3. Identifikasi sapogenin steroid atau triterpenoid secara KLT

Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambah 5 ml HCL 2 N, didihkan dan tutup dengan corong berisi kapas basah selama 2 jam untuk menghidrolisis saponin. Setelah dingin, netralkan dengan ammonia, kemudian ekstraksi dengan 3 ml n-heksana sebanyak 3 kali, lalu uapkan sampai tinggal 0,5 ml, totolkan pada pelat KLT.

Fase diam : Kiesel Gel GF 254  
Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4:1)  
Penampak noda : - Anisaldehyda asam sulfat  
- Antimon klorida

Adanya sapogenin ditunjukkan dengan terjadinya warna:

- merah ungu (ungu) untuk anisaldehyda asam sulfat
- merah muda untuk antimony klorida

### 4. Identifikasi terpenoid atau steroid bebas secara KLT

Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes etanol, diaduk sampai larut, totolkan pada fase diam. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

Fase diam : Kiesel gel GF 254  
Fase gerak : n-heksana–etil asetat ( 4 : 1)  
Penampak noda : Anisaldehyda asam sulfat

Adanya terpenoid atau steroid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu

## LATIHAN IV IDENTIFIKASI SENYAWA GOL. FLAVONOID

**Tujuan :**

Mahasiswa mengetahui cara identifikasi senyawa golongan Flavonoid

**Bahan :**

Ekstrak simplisia "X"

**Cara Kerja :****1. Reaksi Warna**

0,3 gram ekstrak dikocok dengan 3 ml n-heksana berkali-kali sampai ekstrak n-heksana tidak berwarna. Residu dilarutkan dalam etanol dan dibagi menjadi 4 bagian, masing-masing disebut sebagai larutan IIIA, IIIB, IIIC, dan IIID.

**a. Uji Bate-Smith dan Metcalf**

Larutan IIIA sebagai blanko, larutan IIIB ditambah 0,5 ml HCl pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan-lahan menjadi warna merah terang atau ungu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin (dibandingkan dengan blanko).

**b. Uji Wilstater**

Larutan IIIA sebagai blanko. Larutan IIIC ditambah 0,5 ml HCl pekat dan 4 potong magnesium. Diamati warna yang terjadi. Diencerkan dengan air suling, kemudian ditambahkan 1ml butanol. Diamati warna yang terjadi di setiap lapisan. Perubahan warna merah jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, merah tua menunjukkan adanya flavonon.

**2. Kromatografi Lapis Tipis**

Larutan IIID ditotolkan pada fase diam, Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:

- Fase diam : lapisan tipis selulose  
(diganti Kiesel Gel GF 254)
- Fase gerak : butanol-asam asetat glacial-air (4 : 1 : 5)
- Penampak noda : - pereaksi sitrat borat atau  
- uap ammonia

Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif.

Noda kuning yang ditimbulkan oleh uap ammonia akan hilang secara perlahan ketika ammonianya menguap meninggalkan noda. Sedangkan noda kuning yang ditimbulkan oleh pereaksi sitrat borat sifatnya permanen.

Fase gerak tersebut biasa disebut **BAW** (butanol, Acetic acid, Water). BAW dibuat dengan cara mencampur ketiga komponen tersebut. Dengan perbandingan  $B : A : W = 4 : 1 : 5$ , maka akan terjadi 2 lapisan. Lapisan atas diambil dan dipakai sebagai fase gerak untuk mengevaluasi senyawa golongan flavonoid.

## LATIHAN V

### IDENTIFIKASI SENYAWA GOL. POLIFENOL DAN TANIN

**Tujuan :**

Mahasiswa mengetahui cara identifikasi senyawa golongan polifenol dan tanin

**Bahan :**

Ekstrak simplisia "X"

**Cara Kerja :****1. Reaksi Warna**

0,3 gram ekstrak ditambah 10 ml akuades panas, diaduk dan dibiarkan sampai temperature kamar, lalu tambahkan 3-4 tetes 10% NaCl, diaduk, dan disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian masing-masing  $\pm$  4 ml dan disebut sebagai larutan IVA, IVB dan IVC.

**a. Uji Ferriklorida**

Larutan IVC diberi beberapa tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ , kemudian diamati terjadinya perubahan warna. Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin. Jika pada penambahan gelatin dan NaCl tidak timbul endapan tetapi setelah ditambahkan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$ , terjadi perubahan warna menjadi hijau biru hingga hitam, menunjukkan adanya senyawa polifenol.

$\text{FeCl}_3$  positif, uji gelatin positif  $\longrightarrow$  tanin (+)

$\text{FeCl}_3$  positif, uji gelatin negatif  $\longrightarrow$  polifenol (+)

$\text{FeCl}_3$  negatif  $\longrightarrow$  polifenol (-), tanin (-)

**b. Uji Gelatin**

Larutan IVA digunakan sebagai blanko, larutan IVB ditambah dengan sedikit larutan gelatin dan 5 ml larutan NaCl 10%. Jika terjadi endapan putih menunjukkan adanya tanin.

**2. Kromatografi Lapis Tipis**

Sebagian larutan IVA digunakan untuk pemeriksaan dengan KLT.

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : Kloroform – etil asetat (1 : 9)

Penampak noda: Pereaksi  $\text{FeCl}_3$

Jika timbul warna hitam menunjukkan adanya polifenol dalam sampel



## LATIHAN VI

### IDENTIFIKASI SENYAWA GOL. ANTRAKINON

**Tujuan :**

Mahasiswa mengetahui cara identifikasi senyawa golongan antrakinon

**Bahan :**

Ekstrak simplisia "X"

**Cara Kerja :****1. Reaksi Warna****a. Uji Borntrager**

Ekstrak sebanyak 0,3 gram diekstraksi dengan 10 ml air suling, saring, lalu filtrat diekstraksi dengan 3 ml toluena dalam corong pisah. Ekstraksi dilakukan sebanyak dua kali. Kemudian fase toluena dikumpulkan dan dibagi menjadi dua bagian, disebut sebagai larutan VA dan VB. Larutan VA sebagai blanko. Larutan VB ditambah ammonia dan dikocok. Warna merah menunjukkan adanya senyawa antrakinon.

**b. Uji Modifikasi Borntrager**

Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditambah dengan 1 ml KOH 5N dan 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> encer. Dipanaskan dan disaring, filtrat ditambah asam asetat glasial, kemudian diekstraksi dengan toluena. Fase toluena diambil dan dibagi menjadi dua sebagai larutan VIA dan VIB. Larutan VIA sebagai blanko, larutan VIB ditambah ammonia. Warna merah atau merah muda pada lapisan alkalis menunjukkan adanya antrakinon.

**2. Kromatografi Lapis Tipis**

Sampel ditotolkan pada fase diam dengan kondisi kromatografi lapis tipis sebagai berikut:

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : toluena – etil – asam asetat (75 : 24 : 1)

Penampak noda : larutan 10% KOH dalam metanol.

Timbulnya noda berwarna kuning, kuning coklat, merah ungu atau hijau ungu menunjukkan adanya senyawa antrakinon.

## BAB II PEMBUATAN EKSTRAK

### LATIHAN VII PEMBUATAN EKSTRAK DENGAN MASERASI

#### **Tujuan**

Mahasiswa mengetahui cara pembuatan ekstrak nabati dengan maserasi

#### **Bahan :**

Simplisia *Curcuma xanthorrhiza*

#### **Cara Kerja**

Sebanyak 500 gram serbuk kering dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan etanol 96% sebanyak 7 ½ kali bobot serbuk dan diaduk. Biarkan termaserasi selama 5 hari dalam maserator tertutup dengan pengadukan setiap hari. Setelah itu saring maserat dari ampas dengan corong *Buchner*. Maserat dienapkan selama 2 hari. Setelah itu pisahkan maserat dari enapan dengan hati-hati. Uapkan maserat dalam cawan porselen diatas penangas air atau dengan penguap putar (*rotavapour*) sehingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental yang diperoleh diendapkan kembali dengan menambahkan etanol berlebih. Dan didiamkan selama 2 hari. Selanjutnya disari dengan bantuan pipa penghisap.

## LATIHAN VIII

### PEMBUATAN EKSTRAK DENGAN PERKOLASI

**Tujuan**

Mahasiswa mengetahui cara pembuatan ekstrak nabati dengan perkolasi

**Bahan :**

Simplisia *Curcuma xanthorrhiza*

**Cara Kerja**

Pembasahan : Sebanyak 500 gram serbuk bahan kering ditambahkan etanol 96% sebanyak 1/2 sampai sama banyak dari bobot serbuk, sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan hati-hati. Biarkan terendam selama 2 jam.

Perkolasi : Bagian bawah perkolator diisi dengan kapas kemudian diberi kertas saring di atasnya. Tambahkan bahan yang sudah dibasahi dan tambahkan cairan penyari sampai kurang lebih  $\frac{3}{4}$  perkolator. Biarkan termaserasi selama semalam. Keesokan harinya kran perkolator dibuka dengan mengatur kecepatan aliran perkolat. Perkolat ditampung dalam wadah yang disediakan. Monitor cairan penyari di atas serbuk dalam perkolator, jika hampir mencapai permukaan serbuk tambahkan cairan penyari lagi. Perkolasi dilanjutkan sampai cairan di atas serbuk jernih. Perkolat yang diperoleh yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar (rotavapour) menjadi ekstrak.

Ekstrak kental yang diperoleh diendapkan kembali dengan menambahkan etanol berlebih. Dan didiamkan selama 2 hari. Selanjutnya disari dengan bantuan pipa penghisap.

# BAB III

## FRAKSINASI

### LATIHAN IX

#### FRAKSINASI DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM

**Tujuan :**

Mahasiswa mampu melakukan fraksinasi ekstrak tumbuhan dengan kromatografi kolom

**Bahan :**

Ekstrak *Curcuma xanthorrhiza*

**Cara Kerja :**

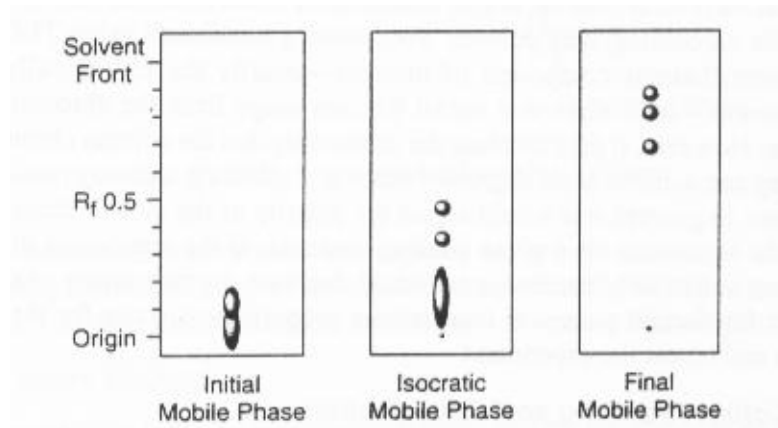
**1. Pencucian Ekstrak**

Ekstrak yang didapatkan dari latihan VII & VIII dimasukkan dalam gelas beker dan ditambahkan etanol 96% panas. Biarkan sampai dengan suhu 50°C, kemudian disaring dengan corong buchner hingga tidak ada etanol yang menetes. Prosedur diatas diulangi hingga diperoleh ekstrak kurkuminoid yang bebas dari pengotornya (ditandai dengan perubahan warna ekstrak menjadi lebih cerah). Ekstrak yang diperoleh kemudian diangin-anginkan di lemari asam hingga kering.

Ekstrak kering selanjutnya difraksinasi untuk mendapatkan isolat kurkumin.

**2. Pemilihan Eluen untuk Fraksinasi**

Standar kurkumin dan ekstrak kurkuminoid yang telah dicuci dilarutkan dalam etanol 96% dan ditotolkan 2-5µl pada lempeng KLT. Lempeng KLT selanjutnya diekspansi dengan menggunakan eluen yang sesuai di dalam bak kromatografi sampai batas yang ditentukan. Amatilah lempeng pada lampu UV 254 nm dan 365 nm. Eluen dipilih apabila ekstrak kurkuminoid yang ditotolkan terpisah menjadi 3 noda yaitu kurkumin, bisdemetoksi kurkumin dan desmetoksi kurkumin. Lihat gambar dibawah ini.

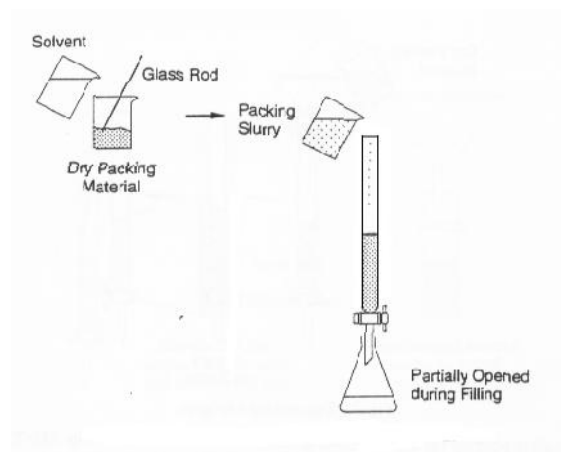


Gambar 4. Lempeng KLT dengan ekstrak kurkuminoid

### 3. Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Langkah-langkah untuk fraksinasi dengan kromatografi kolom adalah sebagai berikut:

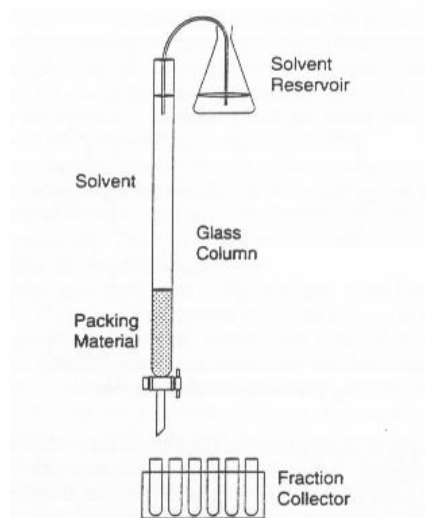
- Silika gel sebanyak 100 kali bobot ekstrak kurkuminoid dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditambahkan dengan eluen  $\pm 2$  cm diatas permukaan silika gel, dikocok pelan hingga merata dan masukkan dengan hati-hati ke dalam kolom kromatografi yang pada bagian bawahnya telah diberi *glass wool*. Kolom tersebut kemudian dibiarkan selama 1 hari untuk memampatkan dan melihat ada tidaknya keretakan (lihat gambar dibawah ini).



Gambar 5. Langkah-langkah pemisahan dengan kromatografi kolom

- Apabila kolom tidak retak, tambahkan eluen 0,5 cm diatas permukaan silika gel dan bila retak ulangi langkah a. Kemudian ke dalam kolom ditambahkan ekstrak kurkuminoid (1% bobot silika) yang telah dicampur dengan silika gel.

- c. Alirkan eluen dan tampung sebanyak  $\pm 50$  ml dalam Erlenmeyer (eluen ini belum membawa zat kimia tanaman sehingga dapat dibuang). Selanjutnya kran dibuka dan diatur penetesannya (1 tetes/detik) dan ditampung dalam vial atau tabung yang telah diberi nomor masing-masing vial 5 ml (lihat gambar dibawah ini).



Gambar 6. Sistem kromatografi kolom dasar

- d. Pada setiap vial dengan kelipatan 10 dilakukan uji KLT untuk melihat noda yang dihasilkan. Apabila menghasilkan noda yang sama vial-vial tersebut digabung. Penetesan dihentikan apabila vial sudah tidak memberikan noda saat diuji KLT.

# BAB IV ISOLASI

## LATIHAN X ISOLASI GLIKOSIDA FLAVONOID DARI DAUN KETELA POHON (*Manihot utilissima* Pohl)

### Tujuan

Pada akhir praktikum diharapkan mahasiswa dapat memahami dan dapat melakukan isolasi flavonoid dari daun ketela pohon berikut analisis kualitatif golongan senyawa tersebut dengan metode kromatografi lapisan tipis.

### Bahan :

Simplisia *Manihot utilissima* Pohl

### Cara Kerja :

#### a. Isolasi :

Timbang 40 gram serbuk bahan, masukkan dalam panci infus dan tambahkan 240 ml air. Didihkan selama 30 menit. Saring campuran melalui corong Buchner sehingga diperoleh filtrat yang jernih dan pindahkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang bersih. Simpan dalam lemari es selama 1 minggu sehingga terbentuk kristal amorf putih kekuningan. Tuangkan sebagian besar larutan jernih dengan hati-hati agar kristal tidak ikut tertuang, kemudian saring kristal yang ada pada dasar erlenmeyer melalui kertas saring yang telah ditara. Jika masih ada kristal yang menempel pada dasar erlenmeyer bilas dengan air suling dan tuangkan bilasan ke kertas saring, cuci kristal dengan 10 ml air es. Keringkan kertas saring bersama endapan pada suhu 50 °C, sampai kering kemudian ditimbang untuk memperoleh rendemen dari hasil yang didapat.

#### b. Identifikasi

Ambil sedikit padatan dengan ujung spatel kecil, larutkan dalam 2 ml campuran metanol air sama banyak, vorteks hingga larut. Larutan siap dianalisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis dengan kondisi sebagai berikut:

- a. Fase diam : Silika gel GF 254
- b. Fase gerak : asam asetat 15 %

- c. Cupilkan : larutan sampel dan pembanding larutan rutin dalam metanol 50 % masing-masing sebanyak 10 totolan
- d. Deteksi : Uap amoniak, dibawah sinar tampak dan UV 366

Setiap kali deteksi, tandai bercak flavonoaid yang terlihat dengan sebuah titik di sebelah kanan dan kirinya. Catat harga Rf dan warna yang terbentuk



## LATIHAN XI

### ISOLASI KAFEIN DARI DAUN TEH

**Tujuan :**

Mahasiswa mengetahui langkah-langkah isolasi, mampu melakukan isolasi kafein dari daun teh dan mengidentifikasi isolat yang diperoleh

**Bahan :**

Simplisia *Camelia sinensis*

**Cara Kerja :****a. Isolasi :**

Sebanyak 20 gram daun teh yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam beaker glass 500 ml, kemudian tambahkan 100 ml aquades dan 5 gram Natrium Karbonat. Campuran tersebut selanjutnya dipanaskan selama 20 menit sambil diaduk-aduk (apabila volume berkurang tambahkan air). Campuran tersebut kemudian disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh dibiarkan dingin, setelah dingin tambahkan larutan asam sulfat 10% hingga pH netral.

Filtrat netral yang diperoleh selanjutnya dimasukkan dalam corong pisah dan ditambah dengan kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) sama banyak. Kocok dan diamkan beberapa saat hingga diperoleh dua fase. Fase diklorematan (bagian bawah) dikumpulkan sedangkan fase air ditambahkan diklormetan seperti pada prosedur diatas.

Fase kloroform yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan penguap putar (*rotavapour*) hingga volume kurang lebih 10 ml. Hasil rotavapor dikumpulkan dan ditambah air panas sedikit ( $\pm 1$  ml), dan simpan dalam lemari es hingga terbentuk kristal kafein ( $\pm 1$  minggu).

**b. Pemurnian (cara sublimasi)**

Masukkan kafein ke dalam cawan porselin kecil, tutuplah dengan kertas saring yang diberi lubang, dan terakhir ditutup dengan corong gelas terbalik yang lubangnya disumbat dengan kapas dan dilengkapi dengan kertas saring berbentuk kerucut. Kemudian cawan dipanasi dengan api kecil (lampu spiritus) pelan-pelan selama 10 menit, dan didinginkan selama 15 menit. Bukalah corong, maka akan didapatkan kristal kafein berbentuk jarum yang akan menempel dibawah kertas saring dalam cawan. Timbang hasil dan diidentifikasi dengan KLT.

**c. Identifikasi**

Ambil sedikit padatan dengan ujung spatel kecil, larutkan dalam kloroform. Larutan siap dianalisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis dengan kondisi sebagai berikut:

- a. Fase diam : Silika gel GF 254
- b. Fase gerak :  $\text{CHCl}_3$  : Etanol (9.5:0.5)
- c. Cupilkan : larutan sampel dan pembanding larutan kafein dalam metanol masing-masing sebanyak 10 totolan
- d. Deteksi : UV 254

Catat harga Rf dan bandingkan dengan harga Rf standar Kafein

## LATIHAN XII

### ISOLASI PIPERIN DARI FRUCTUS PIPERIS NIGRI ATAU ALBI

#### **Tujuan:**

Mahasiswa diharapkan dapat memahami prinsip dan melakukan isolasi piperin dari *Piperis nigri fructus* atau *Piperis albi fructus* beserta analisis kualitatif hasil isolasi dengan metode kromatografi lapisan tipis.

#### **Bahan dan Alat**

##### **Bahan:**

*Piper nigrum* atau *Piper album*

#### **Cara Kerja**

##### **a. Isolasi :**

Timbang 30 gram serbuk merica, masukkan ke dalam alat penyari Soxhlet yang telah dipasang kertas saring, kemudian tambahkan etanol 96% paling sedikit sebanyak 2 kali sirkulasi ( $\pm$  120 ml). Jangan lupa untuk menambahkan batu didih. Penyarian dilakukan selama 2 jam dengan kecepatan 6-8 sirkulasi per jam. Setelah dingin, pisahkan sari dari bagian yang tidak terlarut dengan penyaringan melalui kertas saring. Filtrat yang diperoleh diuapkan diatas pemanas air sampai kering atau konsistensi kental. Kemudian tambahkan 10 ml KOH-etanolik 10% sambil diaduk-aduk sehingga timbul endapan. Setelah mengendap, pisahkan sari dari bagian yang tidak larut melalui glass wool. Sari jernih yang didapat didiamkan dalam almari es sampai hari praktikum yang akan datang, atau sampai pembentukan kristal optimal.

##### **b. Pemurnian**

Kristal yang timbul dipisahkan, dicuci dengan etanol 96% (dingin) dan dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 40 °C selama 30-45 menit kemudian disimpan dalam eksikator yang dilengkapi kapur tohor. Kristal yang diperoleh di timbang dan diidentifikasi dengan KLT.

##### **c. Identifikasi**

Ambil sedikit padatan dengan ujung spatel kecil, larutkan dalam etanol. Larutan siap dianalisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis dengan kondisi sebagai berikut:

- a. Fase diam : Silika gel GF 254
  - b. Fase gerak : Diklormetana : Etil asetat (75 : 25)
  - c. Cupilkan : larutan sampel
  - d. Deteksi : UV 254, disemprot dengan anisaldehyd asam sulfat dan dipanaskan 110 °C selama 10 menit
- Catat harga Rf yang diperoleh.

## LATIHAN XII

### ISOLASI MINYAK ATSIRI DARI RIMPANG *Curcuma xanthorrhiza*

#### Tujuan praktikum :

Setelah mengikuti praktikum, diharapkan mahasiswa dapat memahami prinsip isolasi minyak atsiri dan dapat mengerjakan isolasi beserta identifikasinya dengan kromatografi lapis tipis.

#### Bahan dan Alat

##### Bahan:

Simplisia *Curcuma xanthorrhiza*

#### Cara Kerja

##### a. Isolasi :

Timbang 15 gram serbuk *C. xanthorrhiza*, masukkan ke dalam labu destilasi stahl kemudian tambahkan air sebanyak 300 mL dan batu didih. Hubungkan labu dengan pendingin dan alat penampung berskala seperti gambar. Didihkan labu dengan pemanasan yang sesuai selama 3 jam atau sampai minyak atsiri terdestilasi secara sempurna dan tidak bertambah lagi dalam bagian penampung berskala.

Jika sejumlah volume minyak atsiri tertampung dalam bagian penampung berskala, pencatatan dapat dilakukan dengan pembacaan sampai 0,1 mL, dan volume minyak atsiri ditentukan untuk setiap 100 gram serbuk kering. Kemudian tampung minyak atsiri yang diperoleh dalam vial.

##### b. Identifikasi

Kromatografi lapis tipis :

- a. Fase diam : Silika gel GF 254
- b. Fase gerak : Toluena : Etil asetat (93:7)
- c. Cuplikan : minyak atsiri hasil destilasi
- d. Deteksi : UV 254



## DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 1977, *Materia Medika Indonesia*, Jilid I, Departemen Kesehatan RI, Jakarta

Anonim, 1978, *Materia Medika Indonesia*, Jilid II, Departemen Kesehatan RI, Jakarta

Anonim, 1979, *Materia Medika Indonesia*, Jilid III, Departemen Kesehatan RI, Jakarta

Anonim, 1980, *Materia Medika Indonesia*, Jilid IV, Departemen Kesehatan RI, Jakarta

Anonim, 1989, *Materia Medika Indonesia*, Jilid V, Departemen Kesehatan RI, Jakarta

Anonim, 1995, *Materia Medika Indonesia*, Jilid VI, Departemen Kesehatan RI, Jakarta

Claus EP., 1961, *Pharmacognosy*, 4 nd Ed., Lea and Febiger, Philadelphia

Stahl, E., 1973, *Drug analysis by Chromatography and Microscopy*, Ann Arbor Science Publisher, Inc.