

PETUNJUK PRAKTIKUM FITOKIMIA II



**PROGRAM STUDI ILMU FARMASI
FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
2015**

KATA PENGANTAR

Buku Petunjuk Praktikum Fitokimia I ini disusun untuk menunjang mata kuliah Fitokimia II dalam program studi Farmasi UEU.

Diharapkan dengan buku ini, mahasiswa lebih memahami tata cara dan prosedur pelaksanaan praktikum sehingga mahasiswa memiliki kemampuan melakukan dan mengevaluasi hasil praktikum sesuai dengan teori dasar yang telah diberikan. Mudah-mudahan usaha ini dapat membantu tugas mahasiswa dalam menempuh studinya.

Sebagai akhir kata, penyusun mengucapkan terima kasih kepada staf pengajar, karyawan, asisten, dan sejawat lainnya yang telah memberikan saran dan bantuannya hingga terbentuknya Buku Petunjuk ini.

Penyusun :

- Dr. Aprilita Rina Yanti Eff., M.Biomed., Apt.
- Sri Teguh Rahayu, M.Farm., Apt.
- Irvani Rakhmawati, M.Farm

PENDAHULUAN

Pada decade terakhir ini fitokimia atau kimia tumbuhan telah berkembang menjadi satu disiplin tersendiri, berada diantara kimia organik bahan alam dan biokimia tumbuhan, serta berkaitan erat antara keduanya. Bidang perhatiannya adalah aneka ragam senyawa organik yang dibentuk dan ditimbun oleh tumbuhan, yaitu struktur kimianya, biosintesisnya, perubahan serta metabolismenya, penyebaran secara alamiah serta fungsi biologinya.

Pada praktikum fitokimia I ini, praktikum yang dilaksanakan meliputi: skrining fitokimia, kromatografi lapis tipis dan analisa dan identifikasi jamu.

Simplisia bahan tumbuhan obat merupakan bahan baku proses pembuatan ekstrak, baik sebagai bahan obat atau produk. Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pectin (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa kimia murni.

Materia medika Indonesia berlaku sebagai pedoman untuk simplisia yang akan dipergunakan untuk keperluan pengobatan, tetapi tidak berlaku bagi bahan yang akan dipergunakan untuk keperluan lain yang dijual dengan nama yang sama. Namun simplisia (yang digunakan pada praktikum ini) adalah simplisia nabati secara umum merupakan produk hasil tumbuhan obat setelah melalui proses pasca panen dan proses preparasi secara sederhana menjadi bentuk produk kefarmasian yang siap dipakai atau diproses selanjutnya, yaitu:

1. Siap dipakai dalam bentuk serbuk halus untuk diseduh sebelum diminum (jamu)
2. Siap dipakai untuk dicacah dan digodok sebagai jamu godokan (infus)
3. Diproses selanjutnya untuk dijadikan produk sediaan farmasi lain yang umumnya melalui proses ekstraksi, separasi dan pemurnian, yaitu menjadi ekstrak, fraksi atau bahan isolat senyawa murni.

Simplisia sebagai produk hasil pertanian atau hasil pengumpulan tumbuhan liar memiliki kandungan kimia yang tidak dapat dijamin selalu konstan karena adanya perbedaan/variasi pada bibit, tempat tumbuh, iklim, kondisi (umur dan cara panen) serta proses pasca panen dan preparasi akhir

Metode analisis kimia tumbuhan (tahapan fitokimia) meliputi :

1. Determinasi : jenis dalam klasifikasi botani tumbuhan sumber bahan obat yang dianalisis kandungan kimianya, nama latin dan nama daerah
2. Karakterisasi simplisia : spesifikasi atau mutu simplisia, mencakup beberapa parameter farmakognosi (FI, MMI)
3. Skrining golongan kimia : Senyawa bioaktif, metabolit sekunder : alkaloid, flavonoid, asam-asam fenolat, kumarin, kuinon, tannin, saponin, steroid/triterpenoid.
4. Isolasi bahan alam, meliputi: ekstraksi, pemisahan, pemurnian, karakterisasi
5. Uji aktivitas biologi : ekstrak, fraksi, isolat.

I. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia merupakan proses penapisan/pencarian kandungan zat dalam satu golongan atau kandungan zat dalam suatu tumbuhan dari berbagai jenis tumbuhan , serta mengetahui atau mempelajari zat apa saja atau golongan zat apa saja yang terdapat dalam satu jenis tumbuhan..

Persyaratan skrining fitokimia :

- a. Metodenya sederhana
- b. Dapat dilakukan secara cepat
- c. Peralatan sederhana dan sedikit
- d. Metodenya selektif terhadap kandungan zat yang diteliti
- e. Hasilnya memberikan gambaran kuantitatif
- f. Memberikan informasi tambahan yang bernilai

Skrining dapat dilakukan pada simplisia segar maupun simplisia kering. Sebelum dilakukan skrining simplisia terlebih dahulu harus diekstraksi. . Ada dua prosedur ekstraksi, yaitu :

1. Ekstraksi secara dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut melalui beberapa pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (temperatur kamar). Secara teknologi, termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (exhaustive extraction) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan / penampungan ekstrak) terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1 – 5 kali bahan.

2. Ekstraksi secara panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3- 5 kali sehingga proses ekstraksi berjalan secara sempurna.

b. Soxhlet

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

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar) yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 – 50 °C.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur, 96–98° C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air.

Cara ekstraksi lainnya

1. Ekstraksi berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berurutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi jumlah pelarut dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi.

2. Superkritikal karbondioksida

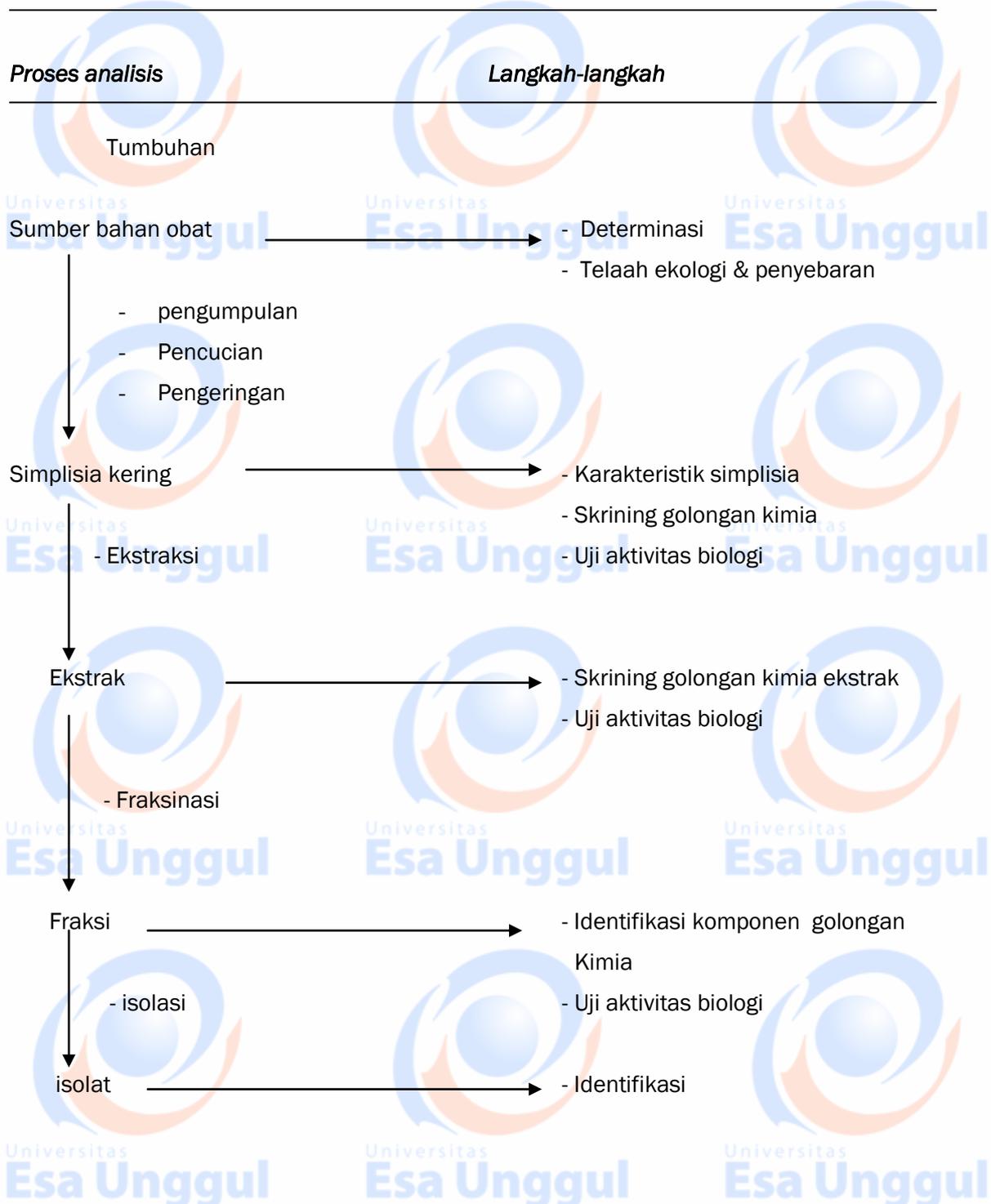
Penggunaan prinsip super kritik untuk ekstraksi serbuk simplisia umumnya digunakan karbondioksida. Dengan variable tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak.

3. Ekstraksi ultrasonik

Getaran ultrasonic (> 20.000 Hz.) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi

4. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta electric discharges yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonic.



KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)

Kromatografi adalah prosedur pemisahan zat terlarut melalui proses migrasi diferensial dinamis yang terdiri dari 2 fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat tersebut menunjukkan adanya perbedaan mobilitas yang disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion.

Proses kromatografi terdiri dari 2 fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang tereluasi lebih awal atau akhir. Umumnya zat terlarut dibawa melalui media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai penyerap seperti alumina, silika gel dan resin penukar ion, atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak.

Partisi merupakan mekanisme pemisahan yang utama dalam kromatografi gas cair, kromatografi kertas dan bentuk kromatografi kolom yang disebut kromatografi cair-cair.

Perbandingan jarak rambat (diukur sampai titik yang memberikan intensitas maksimum pada titik yang memberikan intensitas maksimum pada bercak) suatu cara tertentu terhadap jarak rambat fase gerak, diukur titik penoltolan, dinyatakan sebagai harga R_f senyawa tersebut. Harga R_f berubah sesuai kondisi percobaan karena itu, identifikasi sebaiknya dilakukan dengan menggunakan baku pembanding yang sama dengan uji pada kromatogram yang sama.

Penetapan letak bercak yang dihasilkan kromatografi kertas atau lapis tipis, letaknya dapat ditetapkan dengan :

1. Pengamatan langsung (visual)
2. Pengamatan dengan cahaya UV
3. Disemprot/penampak noda yang sesuai
4. Pencacah Geiger Muller atau teknik autodiografi jika terdapat zat radioaktif
5. Menempatkan potongan penyerap dan zat pada media pembiakan yang telah ditanami untuk melihat hasil stimulasi atau hambatan pertumbuhan bakteri.

A. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT digunakan untuk memisahkan senyawa secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang disebarkan secara merata pada lempeng kaca atau aluminium. Lempeng yang dilapis dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka, dan pemisahannya dapat didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungan keduanya, tergantung dari jenis penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut. Harga R_f yang diperoleh pada KLT tidak tetap, jika dibandingkan dengan yang diperoleh pada kromatografi kertas. Karena itu pada lempeng yang sama di samping kromatogram zat yang diuji perlu dibuat kromatogram zat pembanding, dengan kadar yang berbeda-beda. Perbandingan ukuran bercak secara visual atau densitometri dapat digunakan untuk memperkirakan kadar.

Lempeng yang digunakan juga dapat berupa seng. Fase diam yang digunakan pada KLT adalah silika gel GF254 nm, alumina, poliamil, selulosa. Prinsip kerja yaitu adsorpsi. Fase gerak dapat berupa pelarut organik atau campuran pelarut organik. Sebagai penampak noda dapat digunakan spektrofotometri UV 254 atau 366 nm, pereaksi Dragendorff, anisaldehyd, H₂S)4 10%, dll.

Tujuan dilakukan KLT :

1. Pemisahan senyawa dari sekelompok senyawa
2. Identifikasi zat yang terkandung dalam senyawa
3. Mencari eluen yang cocok untuk kromatografi kolom
4. Identifikasi simplisia

2. Kromatografi Kolom

Alat yang digunakan pada kromatografi kolom sangat sederhana terdiri dari tabung kromatografi dan sebuah batang pemampat yang diperlukan untuk memadatkan wol kaca atau kapas pada dasar tabung jika diperlukan serta untuk memadatkan zat penyerap atau campuran zat penyerap dan air secara merata pada tabung. Tabung berbentuk silinder dan terbuat dari kaca.

Sebagai zat penyerap, misalnya alumina oksida yang telah diaktifkan, silika gel kieselgur terkalsinasi, kieselgur kromatografi murni dalam keadaan kering atau sebagai bubuk, dimampatkan ke dalam tabung kaca atau tabung kwarsa dengan ukuran tertentu dan mempunyai lubang pengalir ke luar dengan ukuran tertentu.

Zat berkhasiat diserap dari larutan secara sempurna oleh bahan penyerap berupa pita sempit pada puncak kolom. Dengan mengalirkan pelarut lebih lanjut, dengan atau tanpa tekanan udara, masing-masing zat turun dengan kecepatan yang khas sehingga terjadi pemisahan. Kecepatan tersebut dipengaruhi oleh beberapa factor yaitu daya serap zat penyerap, sifat pelarut dan suhu dari system kromatografi.

C. Kromatografi Preparatif

Digunakan untuk pemisahan senyawa yang terkandung dalam suatu simplisia dari suatu sekelompok senyawa dimana prinsip kerjanya sama dengan KLT hanya penotolan dilakukan pada jarak yang sangat dekat sehingga mendapatkan bercak berupa pita.

ALAT DAN BAHAN KLT

I. ALAT

- Gelas Ukur
- Corong
- Kertas saring
- pipet tetes
- Lempeng KLT
- Chamber
- Pipa kapiler
- Lampu UV
- DII

II. Bahan

- Ekstrak heksan, kloroform dan etil asetat
- metanol
- kloroform
- heksan
- etil asetat
- butanol
- asam asetat

- air
- asam sulfat
- dragendorf
- anisaldehyd
- Uap amonia
- dll

Cara kerja

1. Uapkan ekstrak yang akan di KLT
2. Siapkan lempeng aluminium/pelat KLT, potong-potong menjadi bagian yang kecil kira-kira berukuran 5 x 1 cm
3. Tandai dengan pensil batas bawah (tempat awal penotolan, kira-kira 0,5 cm dari bagian pelat) dan batas atas (0,5 cm dari bagian atas)



4. Totolkan ekstrak dengan menggunakan pipa kapiler yang telah dikecilkan lubangnyanya dengan dibakar. Keringka sebentar di udara terbuka.
5. Isi chamber yang telah dibersihkan dan dikeringkan serta dilapisi dengan kertas saring dengan pelarut yang akan digunakan, Jenuhkan . Chamber telah jenuh dengan pelarut jika kertas saring seluruhnyanya telah dibasahi oleh pelarut.
6. Masukkan pelat yang telah ditotolkan ekstrak , elusi sampai tanda batas
7. Amati noda yang terbentuk secara visual, di bawah lampu uv dan disemprot dengan penampak bercak yang sesuai
8. Gambarkan hasil KLT pada buku kerja anda.

I. Isolasi Kristal Metil Sinamat dari Rimpang Kencur (*Kaempheriae Rhizoma*)

Tujuan : Mengisolasi kristal metil sinamat dari rimpang kencur

Teori :

RIMPANG KENCUR

- Nama latin : *Kaempheriae Rhizoma*.
- Sinonim : Rimpang Kencur.
- Tanaman Asal : *Kaempheriae Rhizoma*.
- Keluarga : Zingiberaceae
- Pemakaian : Roboransia.
- Bagian yang digunakan : Rimpang.
- Pemerian : Bau khas aromatic, rasa pedas, hangat, agak pahit, akhirnya menimbulkan rasa tebal.
- Tempat tumbuh : Indonesia.
- Makroskopik: Kepingan, pipih, bentuk bundar sampai jorong atau tidak beraturan, Tebal keping 1mm – 4mm, panjang 1cm – 5cm, lebar 0,5cm – 3cm, Bagian tepi berombak dan berkeriput warna coklat sampai coklat Kemerahan. Bagian tengah berwarna putih sampai putih kecoklatan.
- Kandungan kimia : Rimpang Kencur mengandung pati (4,14%), mineral (13,73%), dan minyak atsiri (0,02%) berupa sineol, asam metil kanil dan penta dekaan, asam cinnamic, ethyl aster, asam sinamic, borneol, kamphene, paraeumarin, asam anisic, alkaloid dan gom.
- Alat/ Bahan**
- Alat :**
- Refluks
 - Panci dan kompor
 - Pendingin balik
 - Plat silika dan chamber
 - Batu didih
 - Rotary evaporator
 - Labu alas bulat
 - Erlenmeyer, beacker glass, pipet tetes
 - Timbangan kasar
- Bahan :**
- Rimpang Kencur
 - Reagen-reagen untuk skrinning

- Metanol Destilasi
- Aquadestilata
- Pelarut organik untuk eluen

CARA KERJA

1. SKRINING FITOKIMIA

Tujuan : Untuk mengetahui golongan zat apa saja yang terdapat dalam Rimpang Kencur

Prosedur : lihat petunjuk praktikum fitokimia 1

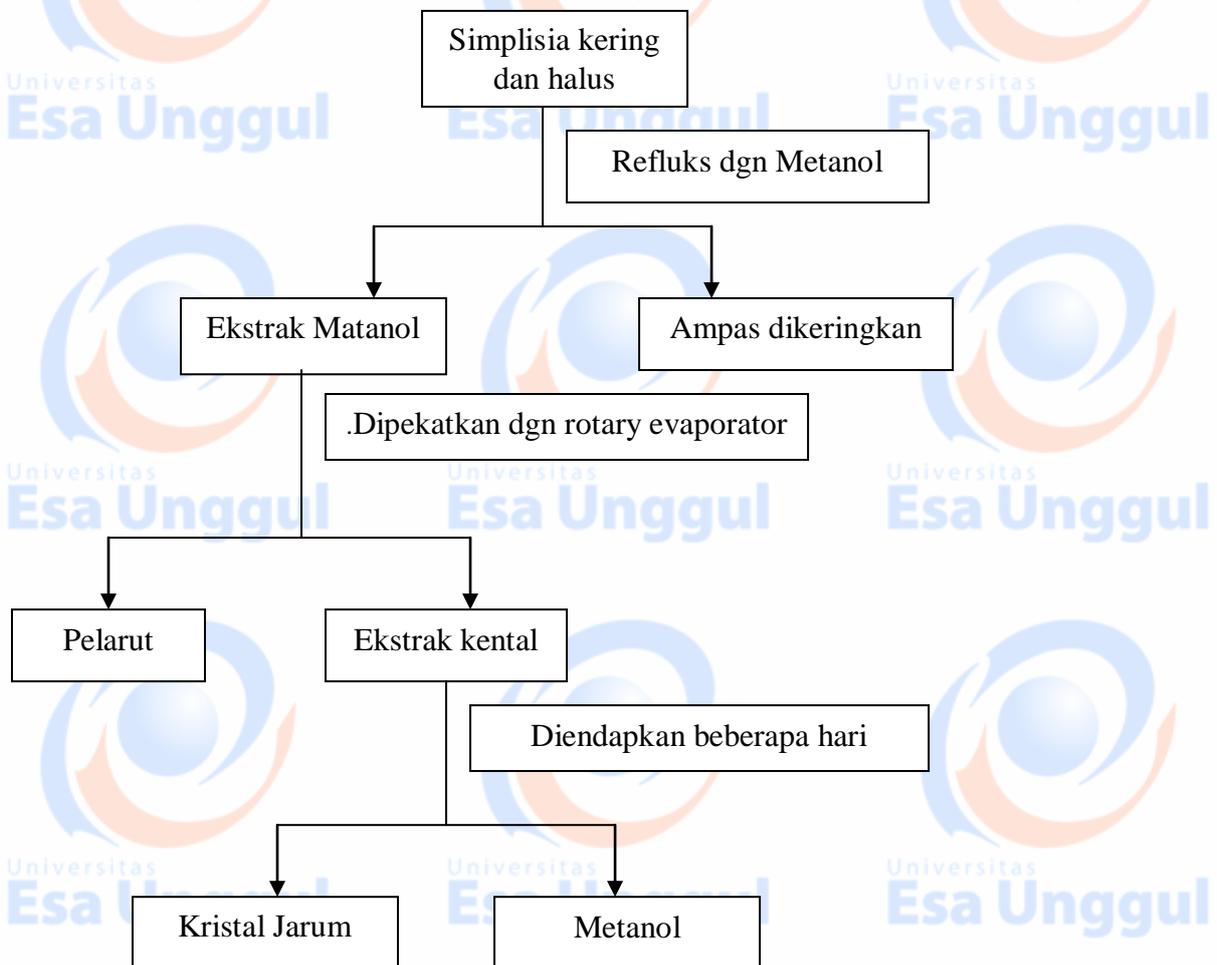
2. ISOLASI METIL SINAMAT

Tujuan : Untuk memisahkan zat kimia yang terkandung dalam tumbuhan.

Metoda : Cara Refluks

1. Siapkan simplisia kering dan halus Rimpang Kencur.
2. Timbang simplisia sebanyak 1 kg, bagi menjadi 2 bagian.
3. Bagian pertama (500 g) refluks dengan menggunakan pelarut metanol yang telah didestilasi, masukkan hingga 3 cm di atas simplisia di dalam labu alas bulat, selama 3 jam, saring, tampung filtrat.
4. Ampas direfluks lagi 3X dengan menggunakan pelarut baru.
5. Ulangi pengerjaan bagian ke-2, seperti pada bagian pertama.
6. Campur hasil ekstraksi bagian 1 dan bagian 2
7. Pekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sampai didapat ekstrak kental.

Bagan Cara Kerja Isolasi Metil Sinamat dari Rimpang Kencur



3. PEMURNIAN

Tujuan : Untuk mendapatkan zat murni hasil isolasi

Metoda : Cara Pengendapan atau Presipitasi

1. Tampung ekstrak kental ke dalam beacker glass dan tutup dengan alumunium foil
2. Endapkan sampai didapat kristal sebanyak-banyaknya.
3. Setelah diperoleh kristal, cuci kristal dengan menggunakan pelarut metanol dingin, sampai kristal bebas dari zat pengotor.
4. Simpan kristal yang telah bersih dalam vial dan tutup dengan alumunium foil

4. IDENTIFIKASI SENYAWA HASIL ISOLASI

Tujuan : - Untuk mengetahui secara pasti senyawa apa yang diperoleh dari hasil isolasi.

- Untuk memastikan kemurnian senyawa yang diperoleh.

Metoda : Identifikasi dengan Spektrofotometri IR

II. Isolasi senyawa flavonoid Kulit Kayu Manis (*Cinnamomi Cortex*)

Tujuan : Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid dari Kulit Kayu Manis (*Cinnamomi Cortex*)

Teori :

KULIT KAYU MANIS

Nama latin : *Cinnamomi Cortex*

Sinonim : Kulit kayu manis, Ceylon Cinnamomi

Tanaman Asal : *Cinnamomum zeylanicum*

Keluarga : Lauraceae

Isi / zat berkhasiat : Minyak atsiri yang mengandung sinamilaldehida, eugenol, zat penyamak, pati, lendir.

Penggunaan : Karminatif, menghangatkan lambung dicampur dengan astringensia lainnya untuk obat mencret.

Bagian yang digunakan : Kulit batang..

Pemerian : Kulit bagian dalam yang diperoleh dari anak batang yang telah dipangkas menjadi semak-semak.

Sediaan : Oleum Cinnamomi (Fl), Sirupus cinnamomi (Form.Ind.), Cinnamomi Tinctura (Fl), Spiritus Cinnamomi (Form.Ind.)

Makroskopik : Tanaman yang berumur 2-3 tahun dipotong beberapa cm di atas tanah. Tunas-tunas baru dipilih 5-6 buah dan dibiarkan tumbuh untuk dipotong lagi setelah mencapai tinggi 2-3 meter. Panen dilakukan pada musim hujan, barang-barang dikuliti arah memanjang menjadi 2 bagian atau lebih. Diberkas dan didiamkan beberapa lama supaya terjadi fermentasi yang nanti mempermudah pengikisan epidermis dan jaringan hijau di bawah epidermis.

Alat/ Bahan

Alat :

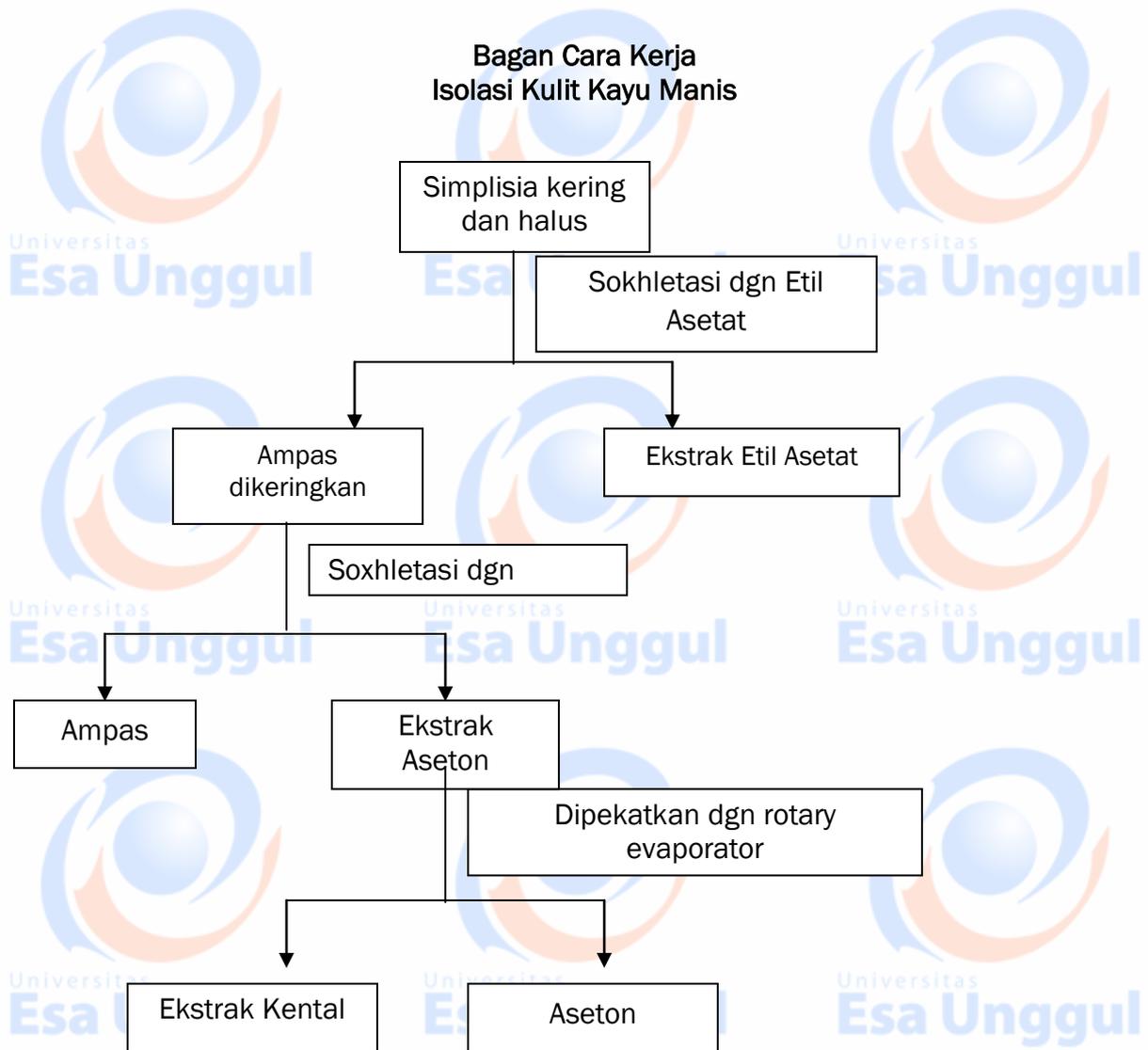
Soxhlet, Batu didih, Spektrofotometer UV, Panci dan kompor, Rotary evaporator, kolom, pendingin balik, labu alas bulat, erlenmeyer, beaker glass, timbangan

2. ISOLASI

Tujuan : Untuk memisahkan zat kimia yang terkandung dalam tumbuhan.

Metoda : Ekstraksi Kulit Kayu Manis (*Cinnamomi Cortex*) dengan Cara Soxhlet.

1. Siapkan simplisia kulit batang kayu manis yang telah halus dan kering, sebanyak 500g.
2. Masukkan simplisia kedalam kantung kertas saring.
3. Kemudian masukkan kantung simplisia kedalam alat soxhlet, ekstraksi dengan pelarut etil asetat, lakukan sampai pelarut yang berada ditampungannya menjadi bening atau selama kira-kira 3 jam.
4. Setelah pengerjaan selesai, kantung yang telah diekstraksi dengan etil asetat, diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut aseton.
5. Aseton hasil ekstraksi dicampur kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental.
6. Tampung ekstrak ke dalam cawan uap yang telah ditimbang sebelumnya, tutup dengan aluminium foil, kemudian keringkan di dalam oven pada suhu 60°C hingga ekstrak menjadi kental seperti massa dodol. Setelah itu dinginkan pada suhu kamar.
7. Massa yang telah terbentuk ditimbang bersama cawan uap, hasil timbangan dikurangi dengan bobot cawan uap kosong, hingga diperoleh bobot zat yang sebenarnya.
8. Tambahkan silika gel ke dalam massa sampel sebanyak setengah kali jumlah bobot sampel, kemudian panaskan di atas water bath hingga terbentuk massa serbuk. Selama pemanasan, massa selalu diaduk agar silika bercampur homogen dengan sampel. Massa ini dipersiapkan untuk kromatografi kolom.



3. PEMISAHAN

a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Tujuan : - Untuk memisahkan senyawa dari sekelompok senyawa

- Untuk mengidentifikasi zat yang terkandung dalam senyawa
- Mencari eluen yang cocok untuk kromatografi kolom.

Prosedur

1. Siapkan ekstrak kayu manis, plat silika dan pipa kapiler yang telah diruncingkan ujungnya.
2. Totolkan ekstrak di atas plat silika yang telah diukur sedemikian rupa, sampai terbentuk noda.

3. Siapkan larutan eluen dengan perbandingan sebagai berikut :
 - a. Hexan 100%
 - b. Hexan : Etil asetat = 9 : 1
 - c. Hexan : Etil asetat = 8 : 2
 - d. Hexan : Etil asetat = 7 : 3
 - e. Hexan : Etil asetat = 5 : 5
 - f. Etil asetat 100%
4. Masukkan plat yang telah ditotolkan ke dalam chamber yang berisi eluen di atas yang sebelumnya sudah jenuh.
5. Tutup chamber, kemudian biarkan eluen naik hingga batas atas plat silika.
6. Angkat plat, kemudian angin-anginkan hingga kering, lalu amati noda yang didapat secara visual dan di dalam lemari UV.
7. Bandingkan jarak noda tiap plat dari masing-masing

b. Kromatografi Kolom

Tujuan : Untuk memisahkan zat hasil ekstraksi

1. Siapkan kolom yang bersih berukuran besar, kemudian bilas dengan hexan, lalu keringkan dengan hair dryer hingga benar-benar kering.
2. Sebagai fase diam digunakan silica gel.
3. Sebagai fase gerak digunakan eluen yang memberikan hasil pemisahan terbaik sewaktu melakukan KLT, yaitu hexan 100 %.
4. Dibuat bubur silica gel dengan menggunakan eluen yang akan dipakai sebagai pengencernya. Lalu masukkan bubur silica gel kedalam kolom secara perlahan. Ketok-ketok kolom menggunakan selang supaya bubur silica gel masuk secara rapat kedalam kolom dan tidak pecah. Masukkan eluen kedalam kolom sehingga silica gel terendam dengan eluen.
5. Masukkan hati-hati sampel kedalam kolom yang telah dicampur dengan silica.
6. Elusi menggunakan pelarut yang sesuai.
7. Apabila pita warna dari zat tidak turun lagi, ganti eluen sesuai dengan eluen pada KLT diatas sampai pita warna turun semua.
8. Tampung pita-pita yang terbentuk kedalam vial yang sudah disiapkan sampai hasil tampungan yang didapat tidak berwarna lagi.

9. Terhadap fraksi-fraksi yang diperoleh, selanjutnya dilakukan KLT.
10. Fraksi yang memiliki harga Rf dan warna noda yang sama digabung ke dalam satu vial.

4. PEMURNIAN

Tujuan : Untuk mendapatkan zat murni hasil isolasi

a. Fraksinasi dengan pelarut yang sesuai

1. Tampung hasil kromatografi kolom ke dalam vial 2 ml
2. Endapkan sampai diperoleh zat pekat
3. Zat pekat yang diperoleh dilarutkan dalam 1 ml Hexan, kemudian tambahkan 1 ml asetonitril.
4. Ambil bagian asetonitril dan identifikasi dengan spektrofotometer UV

5. IDENTIFIKASI SENYAWA HASIL ISOLASI

Tujuan :

- Untuk mengetahui secara pasti senyawa apa yang diperoleh dari hasil isolasi.
- Untuk memastikan kemurnian senyawa yang diperoleh.

Identifikasi dengan Spektrofotometri UV

1. Siapkan Spektrofotometer UV dan Kuvet yang sudah dibilas dengan asetonitril.
2. Masukkan blanko dan zat uji dalam kuvet dan atur panjang gelombang 200-800 nm.

III. ISOLASI ALKALOID DARI LADA HITAM (*PIPER NIGRUM* LINN.)

1) Tujuan :

- * Memisahkan alkaloid murni dari simplisia lada hitam.
- * Identifikasi alkaloid murni dari simplisia lada hitam.
- * Dapat menentukan eluen yang cocok dari alkaloid untuk kromatografi kolom.
- * Skrining simplisia lada hitam dengan pelarut methanol.

2) Alat :

- Alat sokhlet , Rotary evaporator , Erlenmyer
- Beaker glass, Tabung reaksi, Penangas air
- Cawan uap, Pipet tetes, Corong
- Blender u/ menghaluskan simplisia

3) Bahan :

- * Simplisia Lada Hitam yang telah dihaluskan , Pelarut Metanol destilasi
- * Pereaksi Mayer, Dragendorof, Bouchardad, Eluen n-heksan : etil asetat (7:3)
- * KOH 10% dalam methanol
- * Penampak noda Dragendorf

4) Cara Kerja :

1. Skrining fitokimia: lihat prosedur skrining

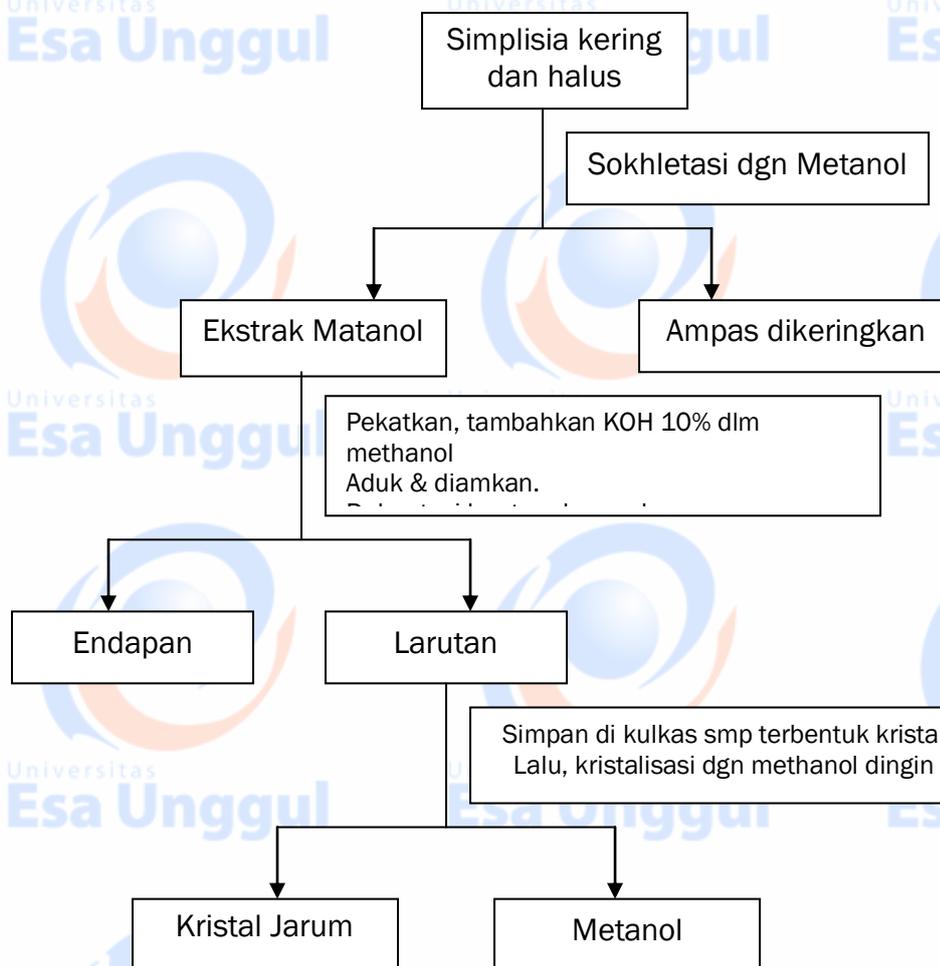
2. Isolasi dengan metode soklet

- a. Siapkan lada hitam yang halus dan kering.
- b. Sebanyak 30 g simplisia, disokletasi dengan pelarut methanol, panaskan hingga diperoleh sari yang jernih.
- c. ekstrak dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.
- d. Lalu lakukan pemisahan, dengan cara ekstrak kental ditambahkan KOH 10% dalam methanol, aduk dan biarkan hingga terbentuk endapan.
- e. Pisahkan endapan dan larutan dengan cara dekantasi, ambil larutannya.
- f. Simpan larutan dalam lemasi es, hingga terbentuk kristal.
- g. Lakukan pemurnian menggunakan methanol dingin, dengan cara mencuci kristal berulang kali.
- h. Lalu timbang kristal jarum berwarna bening yang diperoleh.
- i. Lakukan pengujian karakteristik ekstrak & kristal yang diperoleh, meliputi :
 1. Pemeriksaan organoleptis, meliputi bentuk, rasa, bau dan warna.

2. Pemeriksaan kimia, melalui skrining fitokimia dari senyawa yang polar terhadap methanol.
3. Perhitungan rendamen & hasil kristal murni yang diperoleh.
4. Pemeriksaan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- ** Fase diam : silica gel GF 254
- ** Fase gerak : n-heksan & etil asetat (7:3)
- ** Pendeteksi : lampu UV Camag 254 nm
- ** Penampak noda : Dragendorf

Bagan Cara Kerja Isolasi Alkaloid Lada Hitam



5. Identifikasi Hasil Isolasi

5.1 Pemeriksaan Organoleptis

A. Ekstrak kental

- ⊗ Bentuk
- ⊗ Bau
- ⊗ Rasa
- ⊗ Warna

B. Kristal murni

- ⊗ Bentuk
- ⊗ Bau
- ⊗ Rasa
- ⊗ Warna

Pemeriksaan Kimia

Ekstrak kental (Ekstrak + HCl 2 N)

- + Meyer
- + Dragendorf
- + Baughardad

Kristal murni (Kristal + HCl 2 N)

- + Meyer
- + Dragendorf
- + Baughardad

Perhitungan Rendamen:

$$= \frac{\text{berat hasil ekstraksi}}{\text{berat awal simplisia}} \times 100\%$$

5.2. Kromatografi Lapis tipis

Eluen : heksan etil asetat 7:3 atau chloroform : methanol dengan penampak noda sinar UV dan dragendorf

5.3 Spektroskopi kristal piperin secara infra merah (IR)

IV. ISOLASI GLIKOSIDA DARI PEGAGAN (*CENTELLA ASIATICA (L.) URB.*)

1) Tujuan :

- ✳ Identifikasi glikosida murni dari simplisia pegagan.
- ✳ Skrining simplisia pegagan dengan pelarut methanol.
- ✳ Memisahkan glikosida murni dari simplisia pegagan dengan cara meserasi

2) Alat :

- Botol berwarna gelap , Rotary evaporator, Erlenmyer
- Beaker glass, Tabung reaksi, Penangas air
- Cawan uap, Pipet tetes, Corong
- Blender u/ menghaluskan simplisia

3) Bahan :

- ✳ Simplisia pegagan yang telah dihaluskan
- ✳ Pelarut Metanol destilasi
- ✳ Pereaksi Mayer, Dragendorof, Bouchardad
- ✳ Eluen n-heksan : etil asetat (7 : 3)
- ✳ KOH 10% dalam methanol
- ✳ Penampak noda H₂SO₄ 10 %

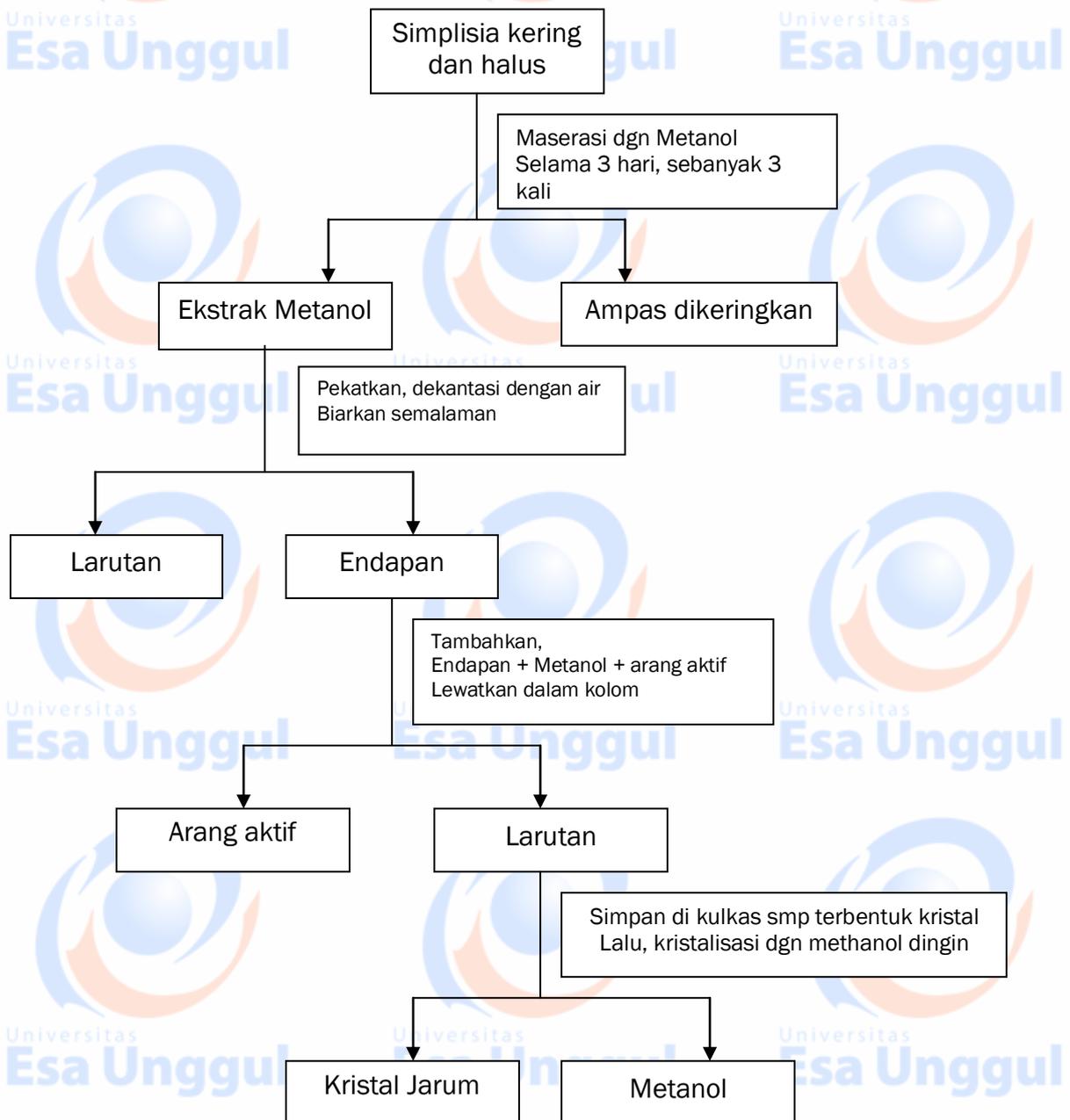
4) Cara Kerja :

- a. Siapkan pegagan yang halus dan kering.
- b. Sebanyak 500 g simplisia, dimaserasi dengan pelarut methanol, diamkan selama 3 (tiga) hari, saring.
- c. Ganti pelarut tiap tig hari, sebanyak tiga kali.
- d. Ekstrak yang diperoleh, dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.
- e. Dekantasi hasil rotary dengan menambahkan air, biarkan semalaman.
- f. Ambil endapannya dan pisahkan dari larutannya.
- g. Siapkan karbon aktif kasar, haluskan sedikit. (keringkan dalam oven 2-3 jam pada suhu 105 °C)

- h. Siapkan kolom, sumbat dengan sedikit kapas.
- i. Campurkan endapan hasil dekantasi dengan methanol destilasi, dan karbon aktif yang telah dikeringkan.
- j. Masukkan dalam kolom. Lewatkan seluruhnya hingga campuran larutan tersebut menetes habis.
- k. Hasil yang diperoleh, dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.
- l. Lalu lakukan pemisahan, dengan cara ekstrak kental ditambahkan KOH 10% dalam methanol, aduk dan biarkan hingga terbentuk endapan.
- m. Pisahkan endapan dan larutan dengan cara dekantasi, ambil larutannya.
- n. Simpan larutan dalam lemasi es, hingga terbentuk kristal.
- o. Lakukan pemurnian menggunakan methanol dingin, dengan cara mencuci kristal berulang kali.
- p. Lalu timbang kristal jarum berwarna bening yang diperoleh.
- q. Lakukan pengujian karakteristik ekstrak & kristal yang diperoleh, meliputi :
- 1) Pemeriksaan organoleptis, meliputi bentuk, rasa, bau dan warna.
 - 2) Pemeriksaan kimia, melalui skrining fitokimia dari senyawa yang polar terhadap methanol.
 - 3) Perhitungan rendamen & hasil kristal murni yang diperoleh.
 - 4) Pemeriksaan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

| | |
|------------------|--|
| ** Fase diam | : silica gel GF 254 |
| ** Fase gerak | : n-heksan & etil asetat (7:3 & 3:7) |
| ** Pendeteksi | : lampu UV Camag 254 nm |
| ** Penampak noda | : H ₂ SO ₄ 10% |

Bagan Cara Kerja Isolasi Glikosida Pegagan



VI. ISOLASI DAN IDENTIFIKASI TERPENOID DARI KULIT BUAH MAHKOTA DEWA [*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.]

I. Tujuan : mengisolasi terpenoid dari kulit buah mahkota dewa

II. Alat

- Erlenmyer, Penjepit tabung reaksi, kaca arloji
- Penangas air, Cawan uap, Pipet, Corong.

III. Bahan :

- Simplisia Kulit buah mahkota dewa yang telah dihaluskan.
 - Pelarut Heksan, Pelarut Kloroform, Pelarut Metanol.
 - Pereaksi Mayer, Dragendorof, Bouchardad, HClp,
 - Logam Mg, NH₄OH, As.asetat anhidrad, Alkohol.

IV. Cara Kerja

1. Skrining Fitokimia

2. Isolasi metoda soklet

1. Timbang sebanyak 30 g simplisia kulit buah mahkota dewa yang sudah dalam bentuk serbuk. Masukkan kedalam alat sokhlet yang telah dilapisi kertas saring, lalu masukkan pelarut heksana sebanyak 300 ml ke dalam labu alas bulat 500 ml dan dipanaskan sampai diperoleh pelarut heksan yang jernih.
2. Ampas mahkota dewa hasil ekstraksi heksan disokhlet lagi dengan pelarut etil asetat, dengan cara yang sama.
3. Proses ekstraksi dilakukan sampai 8 kali dengan cara yang sama.
4. Pekatkan sari etil asetat mahkota dewa dengan Rotary evaporatory sampai diperoleh ekstrak kental.
5. Hitung rendamen

3. Kromatografi lapis tipis dengan berbagai eluen

4. Kromatografi kolom

I. Tujuan :

Untuk mencari noda warna yang sama guna untuk pemurnian

II. Alat :

1. kolom kromatografi
2. botol penampung (vial)
3. statif & klem
4. kapas sebagai saringan

III. Bahan :

1. ekstrak kental kulit buah mahkota dewa
2. Heksan, etil asetat, methanol hasil destilasi
3. eluen : Heksan (4) : etil asetat (1)
4. silica gel

IV. Cara kerja :

A. Persiapan sample :

Sample dikeringkan dengan cara menambahkan silica $\frac{1}{2}$ banyaknya dengan berat sample lalu diuapkan sampai kering lalu digerus sehingga jadi serbuk yang siap untuk dimasukkan kedalam kolom.

B. Persiapan fase diam

- 1) Fase diam yang digunakan secara teoritis 30x sample minimal 10x sample
- 2) Fase diam dibuat bubur dengan campuran heksan, lalu dimasukkan kedalam kolom.

C. Persiapan kolom :

- 1) Kolom dibersihkan dan dikeringkan dari air..
- 2) Masukkan kapas untuk sebagai saringan.
- 3) Masukkan heksan kedalam kolom.
- 4) Masukkan bubur sebagai fase diam yang telah disiapkan kedalam kolom.
- 5) Ketok-ketok dinding kolom dengan selang agar tidak ada gelembung udara didalam kolom.

D. Persiapan eluen :

Eluen yang digunakan heksan : etil (4:1) secara isokratik

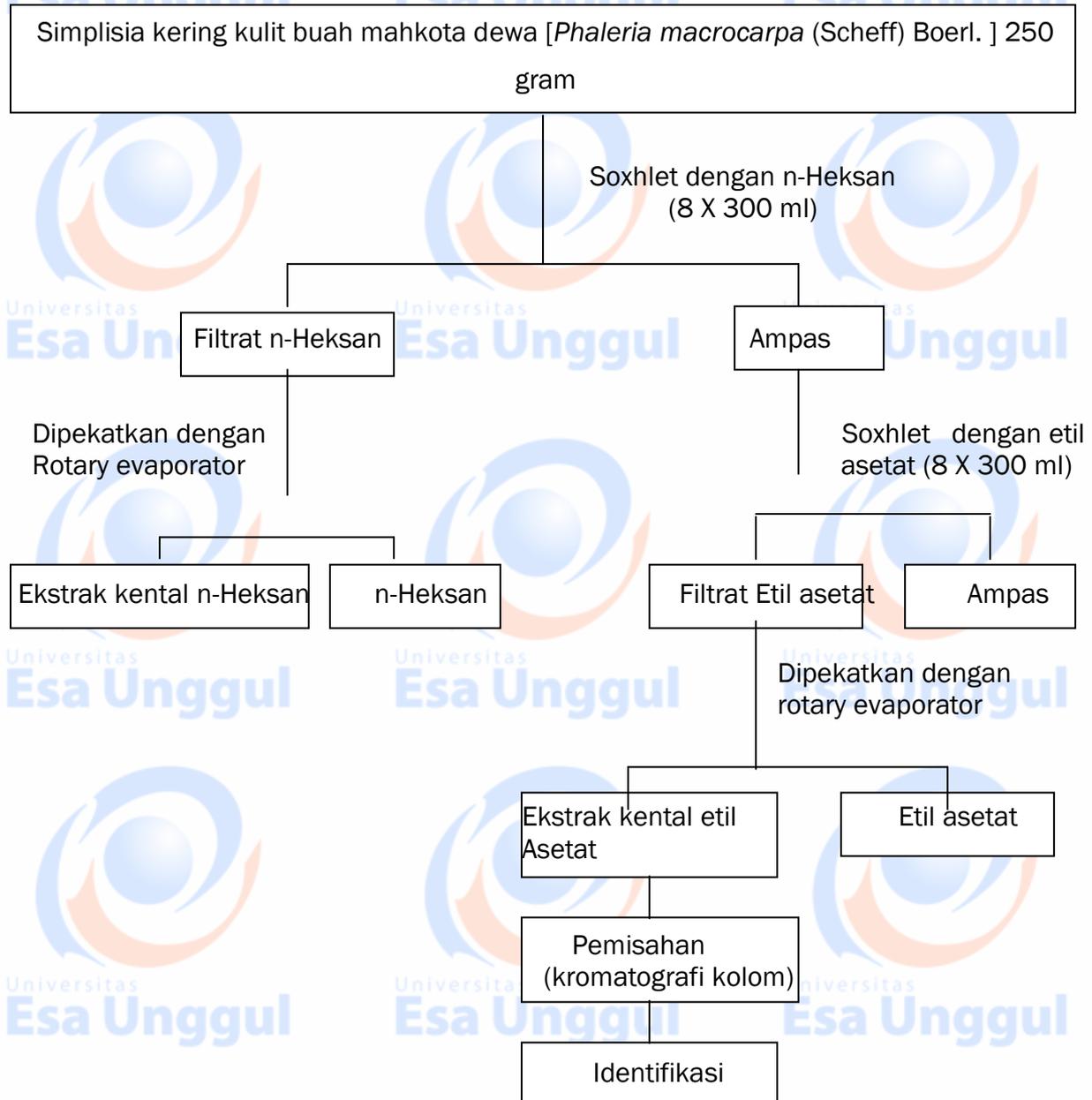
E. Persiapan botol penampung :

Botol penampung bisa erlenmeyer dan bisa juga vial yang telah ditara sebelumnya disesuaikan dengan sample yang dikolom.

F. Pemisahan

1. Sampel dimasukkan kedalam kolom yang telah disiapkan.
2. Tambahkan eluen sedikit demi sedikit (kolom tidak boleh kering)
3. Buka kran kolom dan tampung eluen dengan botol penampung.
4. Volume yang ditampung harus sama.
5. Tiap-tiap fraksi yang keluar ditampung dan masing-masing filtrat diperiksa dengan KLT menggunakan eluen Heksan : Etil asetat (4:1). Filtrat yang mempunyai bercak yang sama digabung menjadi satu fraks.
6. fraksi yang mempunyai noda dominant dilanjutkan dengan pemurnian.
7. Hasil dari pemurnian dilihat spektrumnya dengan Spektrofotometri IR

Skema Isolasi kulit buah mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.]



VII. ISOLASI MINYAK ATSIRI KAPULAGA (*Amomi Fruktus*) DENGAN METODE DESTILASI

Tujuan: Untuk mendapatkan Minyak Atsiri murni dengan cara destilasi

Teori :

Minyak Atsiri merupakan zat berbau yang ditemukan didalam berbagai tumbuhan, menguap diudara pada suhu kamar, sering disebut pula dengan minyak essensial. Minyak Atsiri pada umumnya tidak berwarna, pada penyimpanan lama dapat teroksidasi menjadi resin (dammar) dan berwarna gelap.

Alat Dan bahan :

➤ Alat :

1. Alat destilasi
2. Alat-alat gelas : Erlenmeyer, corong, cawan, pipet tetes, tabung reaksi
3. Penjepit tabung, kompor, Panci, Vial

➤ Bahan :

1. Sampilisia Kapulaga
2. Aqua destillata, minyak Sayur, Natrium sulfat eksikatus
3. Hexan, Metanol, Kloroform
4. Pereaksi mayer, deagendrof, bauchardad
5. HCL pekat, HCL encer, NH₄OH, asam asetat anhirad, alcohol.

Cara kerja

a) Secara skrining fitokimia

b) Isolasi Minyak Atsiri Kapulaga :

1. Sampilisia kapulaga dibuat menjadi serbuk kering terlebih dahulu.
2. Timbang lebih dari 250 gram simplisia, kemudian masukkan kedalam labu alas bulat.
3. Masukkan Aqua destillata sampai simplisia terendam
4. Destilasi selam kurang lebih 3 jam diatas oil bath dan tampung hasil dengan menggunakan vial
5. Hasil yang diperoleh terdapat 2 lapisan, ambil lapisan minyak masukkan Natrium Sulafat eksicatus kedalam vial, agar diperoleh minyak atsiri murni.
6. Identifikasi minyak atsiri : organoleptis, indeks bias, KLT

VIII. ISOLASI FLAVONOID DARI BENALU TEH (*Scrolla atropurpurea*)

Tujuan: Mengisolasi dan mengidentifikasi flavanoid dari benalu teh

Teori

Flavanoid merupakan senyawa yang larut dalam air, dapat diekstraksi dengan etanol 70%. Flavanoid biasanya berbentuk amorf yang berwarna kuning atau kekuningan. Flavanoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavanoid.

Alat :

- Erlenmeyer , - Corong pisah
- Timbangan analitik, - Kertas saring, - Rotary evaporator

Bahan :

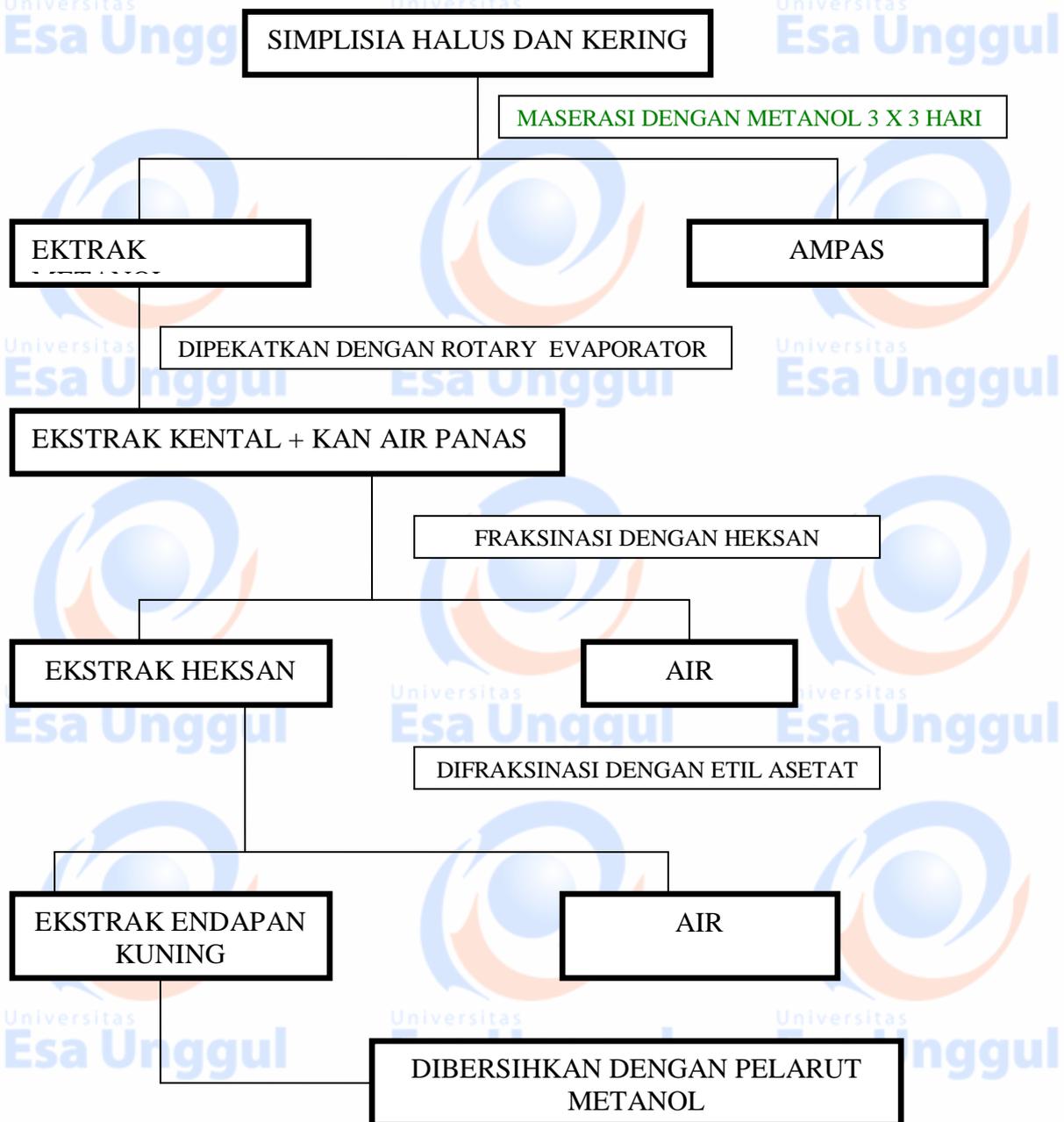
- Benalu the, - Metanol, - Pelarut organic, pereaksi kimia
- Butanol, - Asam asetat anhidrat, - Aquadest, - Reagen skrining

Prosedur kerja

1. Benalu teh yang kering dan halus ditimbang sebanyak 500g, kemudian dimaserasi dengan methanol dalam botol berwarna gelap selama 3x3hari, dimana setiap 3 hari sekali filtrat disaring, kemudian ampas di maserasi kembali.
2. Hasil filtrat maserasi kemudian dipekatkan di rotary evaporator (agar pelarut methanol dapat terpisah dari zat aktifnya) hingga diperoleh ekstrak kental.
3. Kemudian ekstrak kental di(+) kan air panas , setelah itu difraksinasi dengan hexane yang telah didestilasi dengan corong pisah.
4. Lalu pisahkan lapisan hexane dengan lapisan air, selanjutnya lapisan air didekantasi dengan hexane ad warna hijau kekuningan. Kemudian didekantasi kembali dengan campuran hexane dan etil asetat (1:3) yang telah didestilasi sampai terbentuk endapan berwarna kuning.
5. Endapan yang diperoleh dibersihkan dari pengotornya dengan methanol destilasi dan dikeringkan, setelah itu endapan ditimbang untuk dihitung rendamen.
6. Kemudian di KLT dengan eluen BAA.

7. Identifikasi hasil isolasi : rendemen, organoleptis,IR

BAGAN PROSEDUR EKSTRAKSI BENALU TEH



IX. ISOLASI SENYAWA BENZOPHENON DARI KULIT BUAH MAHKOTA DEWA

Tujuan : Mengisolasi dan identifikasi senyawa benzophenon dari kulit buah mahkota dewa

Teori

Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai bahan obat adalah *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. Tumbuhan *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl merupakan salah satu dari genus *Phaleria* yang termasuk dalam famili Thymelaceae. Di Indonesia terkenal dengan nama mahkota dewa. Buah mahkota dewa mengandung senyawa lignan (polyfenol), alkaloida, terpenoid, saponin, flavonoid, dan tanin. Sedangkan daun mahkota dewa mengandung senyawa kimia alkaloid, saponin, dan fenol. Buah mahkota dewa juga banyak mengandung berbagai jenis lemak dan pada getahnya terdapat senyawa-senyawa toluquinone, ethylquinone, sedangkan bijinya mengandung alkaloid.

CARA KERJA

1. Persiapan

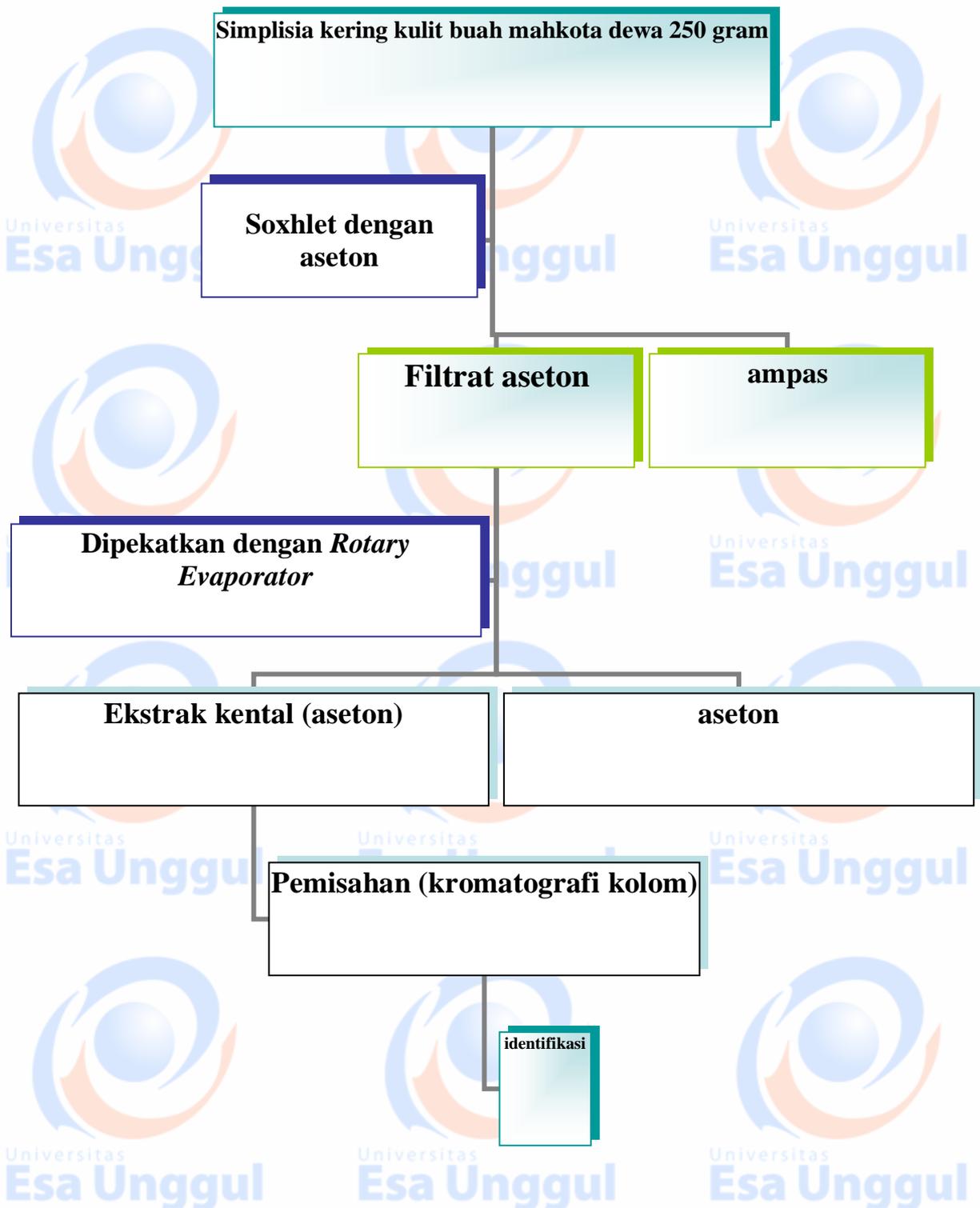
- a. Buah mahkota dewa dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir kemudian daging buah dan kulit buah dipisahkan dari cangkangnya yang berupa serabut-serabut.
- b. Daging dan kulit buah yang diperoleh, diris tipis-tipis dan dikeringkan sampai kering dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar. Pada waktu pengeringan hindari dari sinar matahari langsung untuk mencegah terjadinya kerusakan terhadap kandungan senyawa kimia yang terdapat didalamnya.
- c. Setelah daging dan kulit buah kering, kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.

2. Ekstraksi

- a. Sebanyak 30 gram simplisia *Phaleria macrocarpa* (Scheff)Boerl diekstraksi dengan cara soxhletasi menggunakan pelarut bertingkat berdasarkan kepolarannya secara berturut-turut dimulai dari non polar (n-hexan) dan semi polar (etil aetat, aseton).

- b. Ampas simplisia kering yang telah diekstraksi dengan n-hexan dan etil asetat dimasukkan ke dalam kantong yang terbuat dari kertas saring lalu masukkan ke dalam soxhlet kemudian dibasahi dengan pelarut acetone 300 ml (yang telah didestilasi) yang tertampung ke dalam labu alas bulat 500 ml dan dipanaskan sampai memperoleh pelarut acetone yang jernih. Proses ekstraksi dilakukan 8 kali dengan cara yang sama.
- c. Sari acetone dipekatkan sampai menguap dengan bantuan rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.
- d. Ekstrak tersebut di periksa secara organoleptis dan dilakukan skrining.
- e. Dilakukan pemeriksaan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam plat silica gel dan fase gerak n-hexan : etil asetat (5:5) sebagai deteksi digunakan lampu UV.
- f. Ekstrak disiapkan untuk kromatografi kolom, yaitu dengan menambahkan silica sama banyaknya dengan berat ekstrak sample, lalu diuapkan ad kering lalu digerus sehingga menjadi serbuk yang siap untuk dimasukkan ke dalam kolom.
- g. Kolom yang akan digunakan dibersihkan dan dikeringkan, lalu dibilas dengan heksan (adanya uap air akan mempengaruhi pemisahan).
- h. Masukkan kapas sebagai saringan ujung kolom.
- i. Masukkan hexan ke dalam kolom.
- j. Masukkan bubuk fase diam yang telah disiapkan ke dalam kolom (fase diam dibuat dengan campuran hexan dan silica 10 x sample)
- k. Ketok-ketok dinding kolom supaya gelembung udara yang ada di dalam kolom keluar dan fase gerak rapat di dalam kolom (udara yang ada mempengaruhi pemisahan).
- l. Eluen (hexan : etil asetat 5 : 5) dimasukkan secara isokratik.
- m. Hasil ditampung dalam vial kering yang telah ditara.

BAGAN PROSEDUR PEMISAHAN MAHKOTA DEWA



3. Pemurnian

Setelah mendapat fraksi yang sudah satu noda dilakukan pemurnian dengan cara kristalisasi untuk memisahkan senyawa dari zat – zat pengotor. Pelarut yang digunakan pada pemurnian ini adalah kloroform dan didapatkan serbuk amorf berwarna merah yang murni.

4. Identifikasi

1) Organoleptis

2) Pemeriksaan secara fisika

Pemeriksaan titik lebur dilakukan dengan menggunakan alat pengukur titik lebur (*melthing point*), sampai titik lebur konstan yang menunjukkan titik lebur zat murni yang dapat dibandingkan dengan zat asli.

3) Pemeriksaan secara kimia

Pemeriksaan senyawa benzophenon dilakukan dengan memberikan pereaksi besi (III) klorida yang akan memberikan warna ungu.

4) Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemeriksaan ini menggunakan fase diam plat silica gel 60 GF254 dan fase gerak etil asetat 100 % sebagai pendeteksi digunakan lampu UV.

5) Pemeriksaan Spektrofotometri UV

Pemeriksaan spektrofotometri UV menggunakan 1mg sampel yang dilarutkan dengan kloroform (p.a) dan dideteksi menggunakan spektrometri UV-Vis sehingga terlihat puncak panjang gelombang yang merupakan karakteristik suatu senyawa, kemudian spectrum yang terbentuk direkam. Spektrum yang terbentuk menampilkan serapan dan panjang gelombang sampel tersebut.

X. ISOLASI FLAVONOID DARI DAUN KUCAI (*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng)

Tujuan : Mengisolasi flavonoid dari daun kucai

Teori :

Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air, dapat diekstrakan dengan etanol 70% dan tetap ada dalam larutan air, setelah larutan itu dikocok dengan eter miyak burui. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah jika ditambah basah atau amoniak. Jadi flavonoid mudah dideteksi pada kromatografi atau dalam larutan.

Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan terikal pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran. Jarang sekali hanya dijumpai flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan.

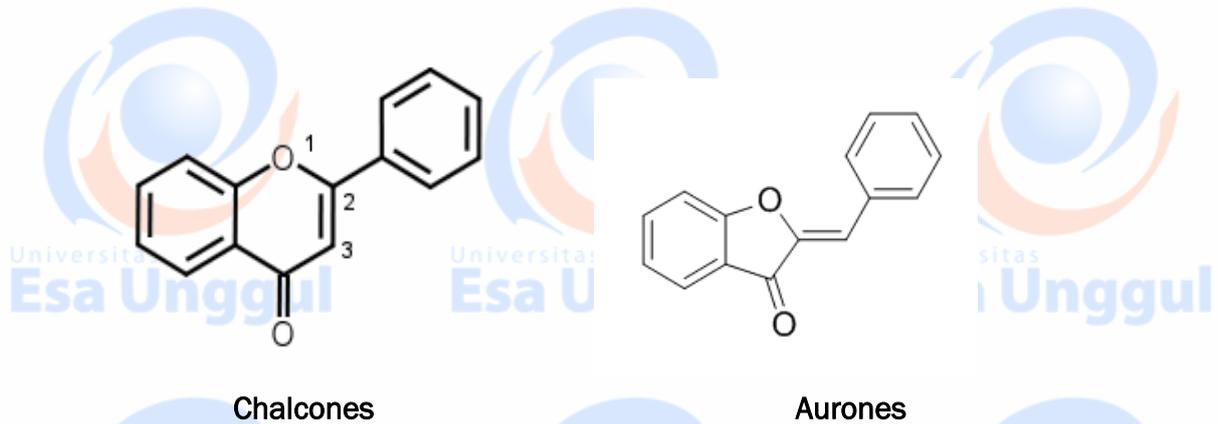
Flavonoid memiliki aktifitas sebagai antioksidan, konsviktor otot polos, anti bakteri, anti virus, anti tumor, diuretic dan anti hepatotoksik.

Flavonoid larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter minyak bumi, merupakan senyawa fenolik, dengan basa atau ammonia warnakan berubah. Menyerap kuat pada daerah UV dan tanpak (aromatic terkonjugasi), dalam tumbuhan berbentuk aglikon dan glikosida.

Flavonoid bisanya berupa amorf yang berwarna kuning atau kekuningan dan pada umunya bersifat polar dengan adanya sejumlah gugus hidroksi yangfonoid adalah tersubtitusi dengan suatu gula. Sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, methanol, air, dan lain-lain. Sebagian dari anglikon flavonoid bersifat kurang polar seperti isoflavon dan flavon serta flavanol yang termetoksilasi lebih mudah larut dalam pelarut non polar seperti eter dan CHCl_3 .

Flavonoid mudah terhidrolisa dalam suasana asam, basa atau dengan enzim. Aglikon flavonoid adalah senyawa polifenol, karena itu mempunyai sifat kimia seperti penol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat laryt dalam basa.

Ini adalah bentuk struktur dari flavonoid itu sendiri. Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mempunyai struktur C6-C3-C6. Tiap bagian C6 merupakan cincin benzene yang terdistribusi dan dihubungkan oleh atom C3 yang merupakan rantai alifatik, seperti yang ditunjukkan pada gambar dibawah ini



Gambar 2 : Jenis-Jenis Flavonoid (Mabry, et al, 1970)

Alat dan bahan

Alat:

- Erlenmeyer
- Tabung reaksi
- Corong pisah
- Batang pengaduk
- Rotary
- Alat destilasi
- Kompor
- Kertas saring

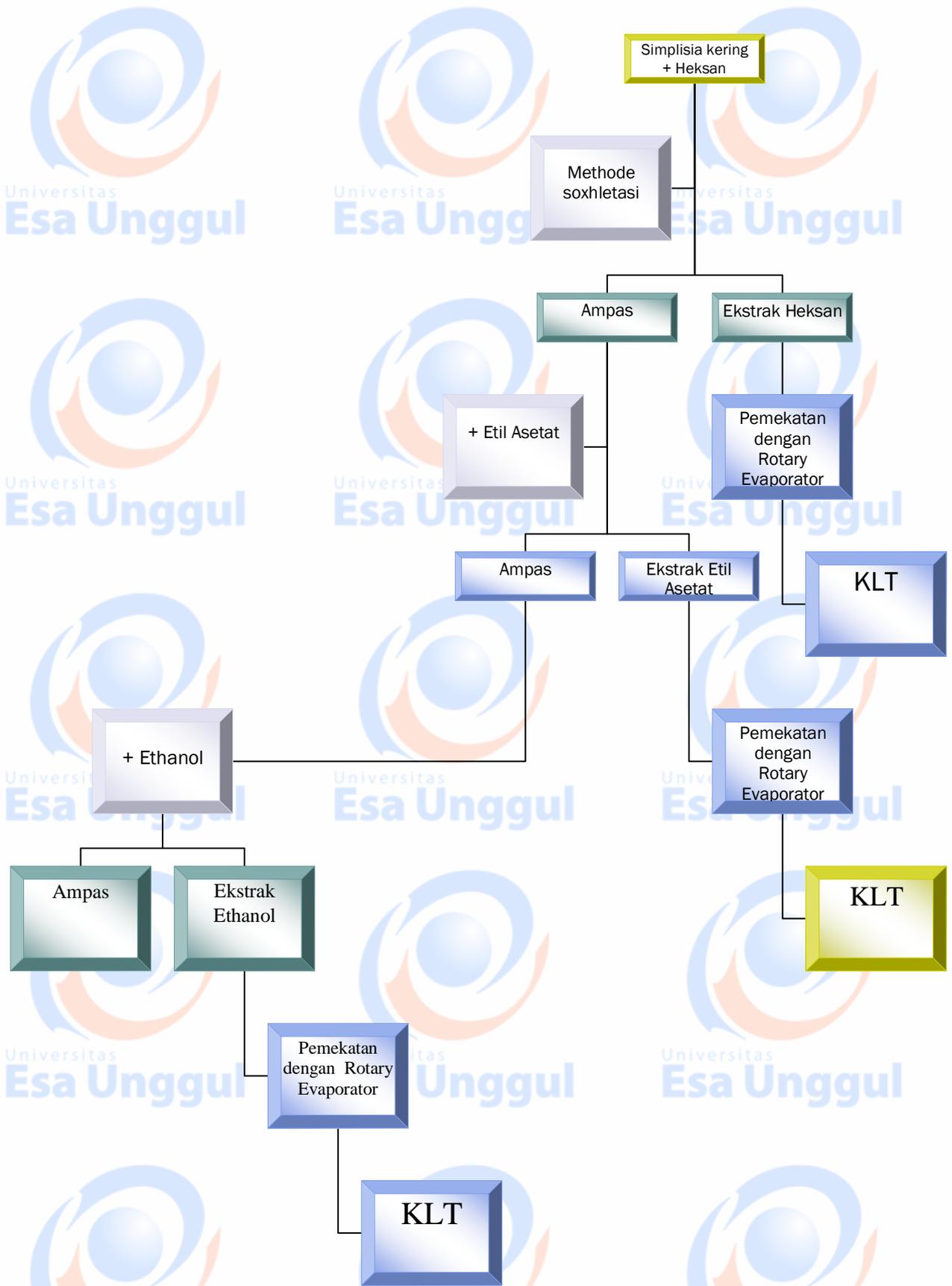
Bahan:

- Heksan
- CHCl₃
- Methanol
- Reagen untuk pereaksi
- Eluen : BAA = 4 : 1 : 5

Heksan : etil asetat = 7 : 3

Cara Kerja

Ekstraksi simplisia dilakukan dengan cara panas secara sinambung menggunakan alat Soxhlet. Pelarut yang digunakan berturut-turut n-heksana-etil asetat-etanol. Pemantauan ekstrak dilakukan dengan menggunakan pengembang yang sesuai, penampak bercak H₂SO₄ 10% dalam metanol dan AlCl₃ 5% dalam etanol.



Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Ekstrak yang terdeteksi mengandung flavonoid dan mempunyai pola kromatogram yang dapat memisahkan semua bercak pada KLT, difraksinasi dengan Kromatografi Cair Vakum menggunakan fase diam silika gel 60 H dan eluen landaian yaitu n-heksana-etil asetat-etanol dengan kepolaran meningkat. Pemantauan fraksi dilakukan dengan menggunakan pengembang yang sesuai, penampak bercak H_2SO_4 10% dalam metanol dan $AlCl_3$ 5% dalam etanol. Fraksi-fraksi yang terdeteksi mengandung flavonoid dan memiliki pola kromatogram yang dapat memisahkan semua bercak pada KLT, dimurnikan dengan KLT preparatif menggunakan pengembang yang sesuai. Bagian kanan dan kiri pelat KLT preparatif disemprot dengan $AlCl_3$ 5% dalam etanol. Pita hasil preparatif diekstraksi dengan metanol, disaring, dipekatkan kemudian diuji kemurniannya dengan KLT tiga pengembangan tunggal dan KLT dua dimensi. Karakterisasi isolat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri ultraviolet-sinar tampak dan spektrofotometri inframerah.



XI . ISOLASI SENYAWA TRITERPENOID DARI BIJI PEPAYA (*Carica papaya*)

Tujuan : Mendapatkan senyawa terpen yakni triterpenoid dari biji pepaya
Dengan metode maserasi dan pemisahan secara kromatografi kolom

Teori

Klasifikasi

Kingdom : Plantae
Divisi :
Kelas :
Ordo :
Famili : Caricales
Genus : Caricaceae
Spesies : *Carica papaya*

Uraian :

Tanaman berbatang tinggi 1-5 M, bunga : majemuk berwarna putih, buah : sejati dengan buah matang daging buah manis biji hitam, saat muda biji berwarna putih bergerombol didalam buah

Kegunaan :

Antelmintik, Antidiare, Skabisid dll

Kandungan Biji pepaya menurut buku Tanaman Obat Indonesia hal 53

Asam lemak

Terpenoid

Flavonoid

Fenol

Saponin

Alat:

- Destilator
- Alat-alat gelas : Erlenmeyer, Corong, Cawan uap, Pipet tetes
- Kompor dan Panci
- Chamber dan pelat KLT, lampu UV
- Kolom kromatografi dan kapas

Bahan:

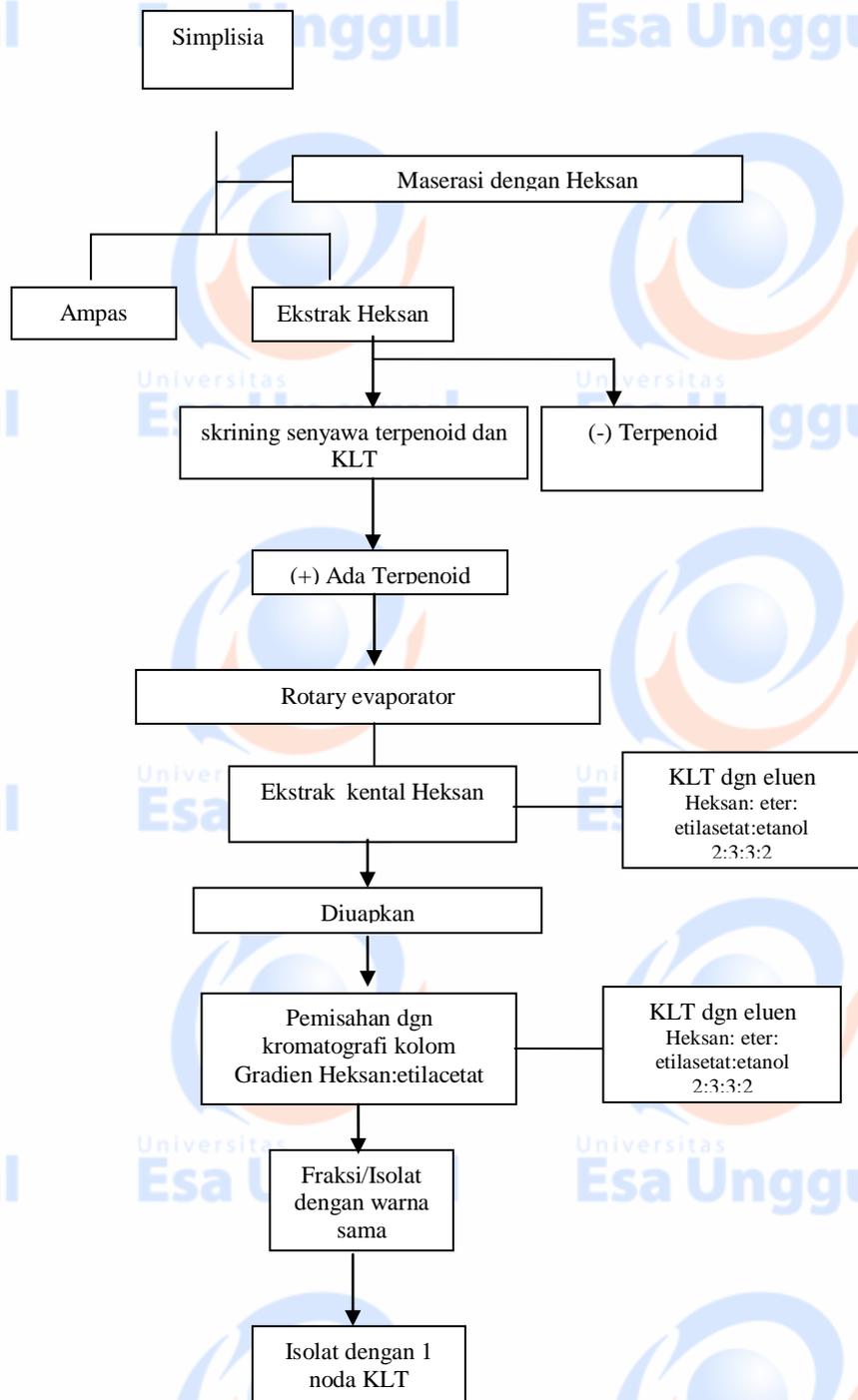
- Biji pepaya
- Berbagai macam pelarut : Etanol, heksan, etilasetat dll
- Silica gel
- Berbagai reagent pereaksi

Cara kerja :

1. Biji pepaya yang berwarna putih dicelupkan kedalam etanol panas kemudian dikeringkan dan dihaluskan.
2. Sebanyak 500 g serbuk kering biji pepaya diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut n-heksana,
3. Ekstrak yang diperoleh diuapkan dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana.
4. Ekstrak kental tersebut dilakukan uji skrining terutama terhadap kandungan triterpenoid didalamnya dengan pereaksi Lieberman-Burchard, ekstrak kental yang mengandung triterpenoid dipisahkan dengan teknik kromatografi kolom.
5. Sebelum dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom terlebih dahulu dilakukan pemilihan eluen dengan teknik KLT hasil pemisahan kromatografi kolom dengan warna yang sama digabungkan dan dikelompokkan menjadi kelompok fraksi.
6. Masing-masing kelompok fraksi tersebut dilakukan skrining terhadap triterpenoid kembali yang dilanjutkan dengan KLT , fraksi yang positif mengandung triterpenoid dan menghasilkan noda spot tunggal maka isolate dapat dikatakan relatif murni mengandung triterpenoid.
7. Identifikasi senyawa hasil isolasi secara spektrofotometri UV-Vis dan IR



Skema kerja ekstraksi triterpenoid dari biji pepaya (Carica Papaya)



XII. ISOLASI ALKALOID DARI BIJI KOPI (*Coffea arabica* L)

1. Tujuan :

- Untuk memisahkan zat kimia yang terkandung dalam tumbuhan.
- Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi alkaloide dari biji kopi.

2. Teori

Kopi (*Coffea spp*) adalah species tanaman berbentuk pohon yang termasuk dalam famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea*. Tanaman ini tumbuhnya tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapan mencapai tinggi 12 m. daunnya bulat telur dengan ujung agak meruncing. daun tumbuh berhadapan pada batang, cabang, dan ranting-rantingnya. Kopi mempunyai sistem percabangan yang agak berbeda dengan tanaman lain. tanaman ini mempunyai beberapa jenis cabang yang sifat dan fungsinya agak berbeda. Biji kopi mengandung 1-3% kofeina, 15% dekstrin, 11-14% protein, 1-2% asam kofeinat, adenin, ksantin serta alkali fosfat dan alkali karbonat.

3. Alat dan Bahan

Alat

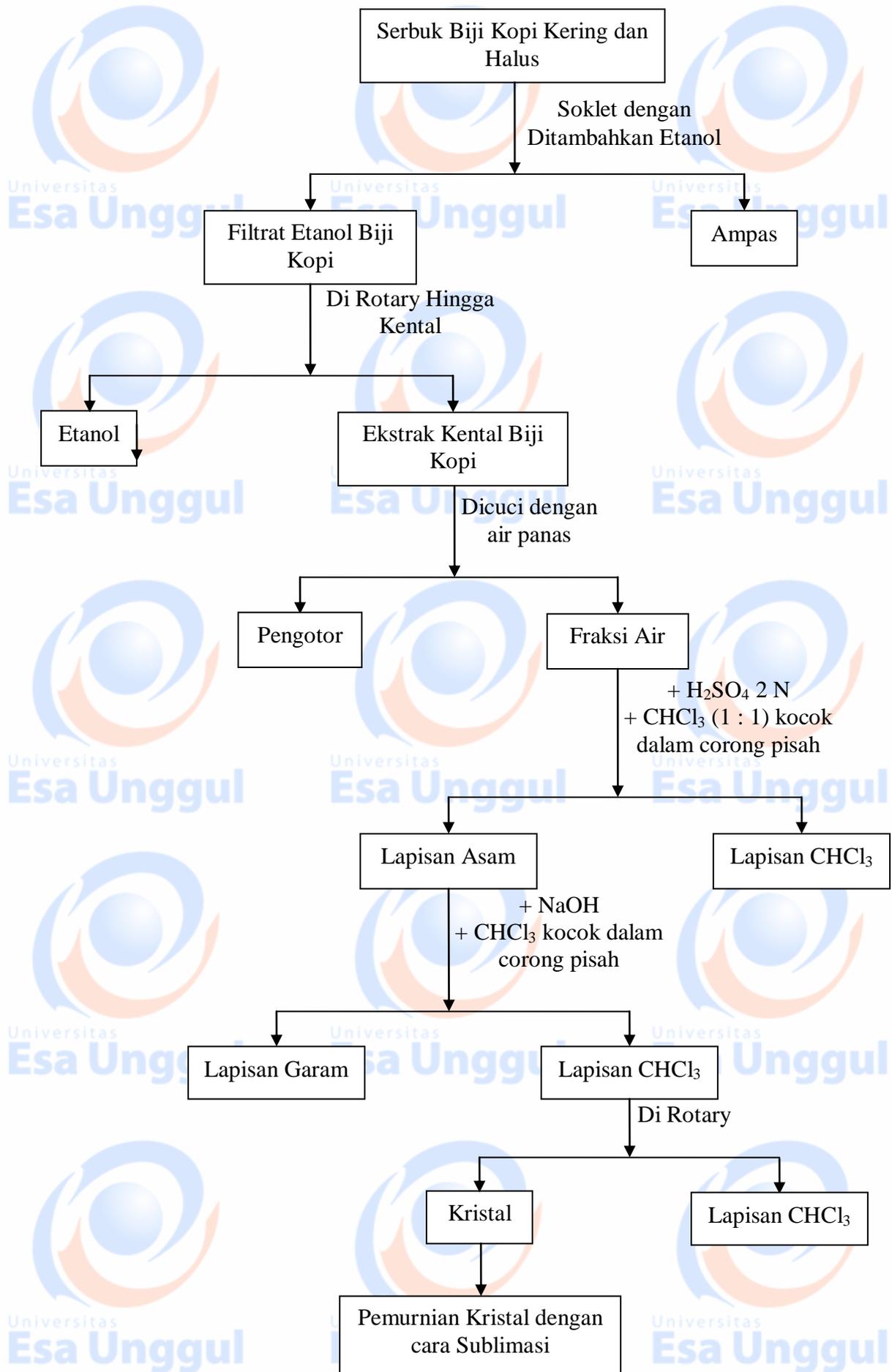
- Alat perkolasi , Rotary Evaporator
- Alat destilasi
- Plat KLT, Chamber
- Erlenmeyer, beaker glass, pipet tetes

Bahan :

- Biji kopi
- Etanol, Metanol, Kloroform, Hexan, Etil asetat
- Aquadest dan Reagen-reagen untuk skrining

Cara kerja

- 1.Skrining dan identifikasi kandungan kimia
- 2.Ekstraksi biji kopi secara sokletasi



XIII. Isolasi & Identifikasi Senyawa Flavonoid

TEMPUYUNG (*Sonchus arvensis* L.)

I. TUJUAN

- Untuk memisahkan zat kimia yang terkandung dalam tumbuhan.
- Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa Flavonoid dari daun Tempuyung

II. Teori

Klasifikasi Ilmiah

- Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Asterales
Famalia : Asteraceae
Genus : *Sonchus* L
Spesies : *Sonchus arvensis* L

Kandungan Kimia

Kandungan kimia dalam tanaman Tempuyung adalah alfa-laktosterol, beta-laktosterol, manitol, inositol, silica, kalium, flavonoid, dan taraksesterol

Khasiat

Tempuyung atau yang lebih dikenal dengan *Sonchus arvensis* L memiliki khasiat sebagai menghilangkan panas dan racun, peluruh kencing (diuretika), penghantur batu (lipotriptil), anti urolitiasis dan menghilangkan bengkak.

ALAT DAN BAHAN

ALAT - ALAT

- Erlenmeyer
- corong
- water bath
- tabung reaksi

- pipet tetes
- plat tetes
- cawan uap
- beaksr glas
- batang pengaduk

- corong pisah
- plat silika gel
- lampu UV
- pipa kapiler
- chamber KLT

BAHAN – BAHAN

- serbuk simplisia kering
- pelarut heksan
- HCl 2 N
- Pereaksi mayer,
- dragendrof,
- bouchardad
- Alkohol
- Asam asetat anhidrat
- NH₄OH 25 %
- NH₄OH 10%
- H₂SO₄ (p)
- Logam Mg
- Fehling A
- Fehling B
- Amil alkohol
- CHCl₃
- Aquadest
- Eluent BAA : (4:1:5)

II. PROSEDUR KERJA

Siapkan alat dan bahan

Skriing bahan terlebih dahulu sebelum memulai isolasi

Isolasi senyawa Flavonoid

Ekstraksi :

500 gram serbuk kering simplisia Tempuyung yang diperoleh dari Baritto Bogaor dimaserasi dengan 1,5 L n-Heksan sambil diaduk hingga tidak diperoleh filtrat yang berwarna. Ampas dikeringkan kemudian dimaserasi dengan 1,5 L n-metanol sambil diaduk hingga filtrat tidak berwarna. Filtrat dikumpulkan kemudian dikeringkan secara vakum menggunakan rotavator hingga diperoleh ekstrak kental.

Pemisahan : 5 mg ekstrak metanol kental dilarutkan dalam 5ml metanol kemudian disentrifuse untuk memisahkan endapan. Filtrat jernih yang diperoleh kemudian ditotolkan hingga memnentuk pita pada bagian bawah kertas whatman n0.2 ukuran 20x20cm. Kertas dikembangkan dengan eluen campuran dari butanol : asam asetat : air (4:5:1). Pita yang diperoleh dipotong – potong kemudian dilarutkan dalam metanol p.a yang sebelumnya dilihat dibawah lampu UV dan sinar tampak 366 nm dan diserapi uap amoniak.

Daftar Pustaka

1. Agoes Goesmin, 2007 . Teknologi Bahan Alam. Penerbit ITB Bandung.
2. Harbone, JB . 1987. Metode Fitokimia Penuntun cara modern menganalisa tumbuhan. ITB Bandung
3. Materia Medika Indonesia
4. Sekolah Farmasi ITB <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>
5. Sirait M. Penuntun Fitokimia Dalam Farmasi, 2007. Penerbit ITB Bandung
6. Soediro Iwang, 2000. Diktat Kuliah Fitokimia. Fakultas Farmasi UNTAG 1945 jakarta
7. Wiryowidagdo S, 2008. Kimia dan Farmakologi Bahan Alam. Penerbit EGC.

