PENUNTUN PRAKTIKUM

KIMIA BAHAN ALAM II

(FRS 213)

Smart, Creative and Entrepreneurial

PROGRAM STUDI

FARMASI

FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN

UNIVERSITAS ESA UNGGUL

JAKARTA

2019

KATA PENGANTAR

Buku Petunjuk Praktikum Kimia Bahan Alam II ini disusun untuk menunjang mata kuliah Kimia Bahan Alam 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 bantuanya hingga terbentuknya Buku Petunjuk ini.

Jakarta, Desember 2018

Tim Pengampu Praktikum Kimia Bahan Alam II

PENDAHULUAN

Pada decade terakhir ini fitokimia atau kimia tumbuhan telah berkembang menjadi satu disiplin tersendiri, berada diantara kimia organic bahan alam dan biokimia tumbuhan, serta berkaitan erat antara keduanya. Bidang perhatiannya adalah aneka ragam senyawa organic 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 diperguankan untuk keperluan lain yang dijual dengan nama yang sama . Namun simplisia (yang digunakan pada praktikum ini) adalah simplisia nabati secara umumk 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 ummnya 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/varisai 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

Skirining 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 smplisia 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 (temperature kamar). Secara tekhnologi, 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 (penetesan/penampungan ekstrak) terus menerus samapi diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1 – 5 kali bahan.

2. Ekstrasi 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 tem,peratur 40 – 50 ^{0} C.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelrut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur, 96–98^{0} 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 berulangkali 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 dianmik 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 meyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonic.

Proses analisis	*Langkah-langkah*
Tumbuhan Sumber bahan obat →	- Determinasi - Telaah ekologi & penyebaran
↓ - pengumpulan - Pencucian - Pengeringan	
Simplisia kering →	- Karakteristik simplisia - Skrining golongan kimia - Uji aktivitas biologi
↓ - Ekstraksi	
Ekstrak →	- Skrining golongan kimia ekstrak - Uji aktivitas biologi
↓ - Fraksinasi	
Fraksi →	- Identifikasi komponen golongan Kimia - Uji aktivitas biologi
↓ - isolasi	
isolat →	- Identifikasi

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)

Kromatografi adalah prosedur pemsahan 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 melali 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, silica gel dan resin penukar ion, atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fgase 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 rf senyawa tersebut. Harga Rf 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 tekhnik 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 Rf 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 silica gel GF254 nm, alumina, poliamil, selulosa . Prinsip kerja yaitu adsorpsi. Fase gerak dapat berupa pelarut organic atau campuran pelarut organik. Sebagai penampak noda dapat digunakan spektrofotometri UV 254 atau 366 nm, pereaksi Dragendorf, anisaldehid, H2S)4 10%, dll.

Tujuan dilakukan KLT :

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

B. Kromatografi Kolom

Alat yang digunakan pada kromatografi kolom sangat sedehana 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, silica gel kieselgur terkalsinasi, kiselgur kromatografi murni dalam keadaan kering atau sebagai bubur, 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 faktor 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
- Dll

II. Bahan

- Ekstrak heksan, kloroform dan etil asetat
- metanol
- kloroform
- heksan
- etil asetat
- butanol
- asam asetat
- air
- asam sulfat
- dragendorf
- anisaldehid
- Uap amonia

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 lubangnya 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 seluruhnya 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 kecur

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
- Batu didih
- Panci dan kompor
- Rotary evaporator
- Pendingin balik
- Labu alas bulat
- Plat silika
- Timbangan kasar
- Erlenmeyer, beaker glass, pipet tetes dan chamber

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.

3. Pemurnian

Tujuan : Untuk mendapatkan zat murni hasil isolasi

Metoda : Cara Pengendapan atau Presipitasi

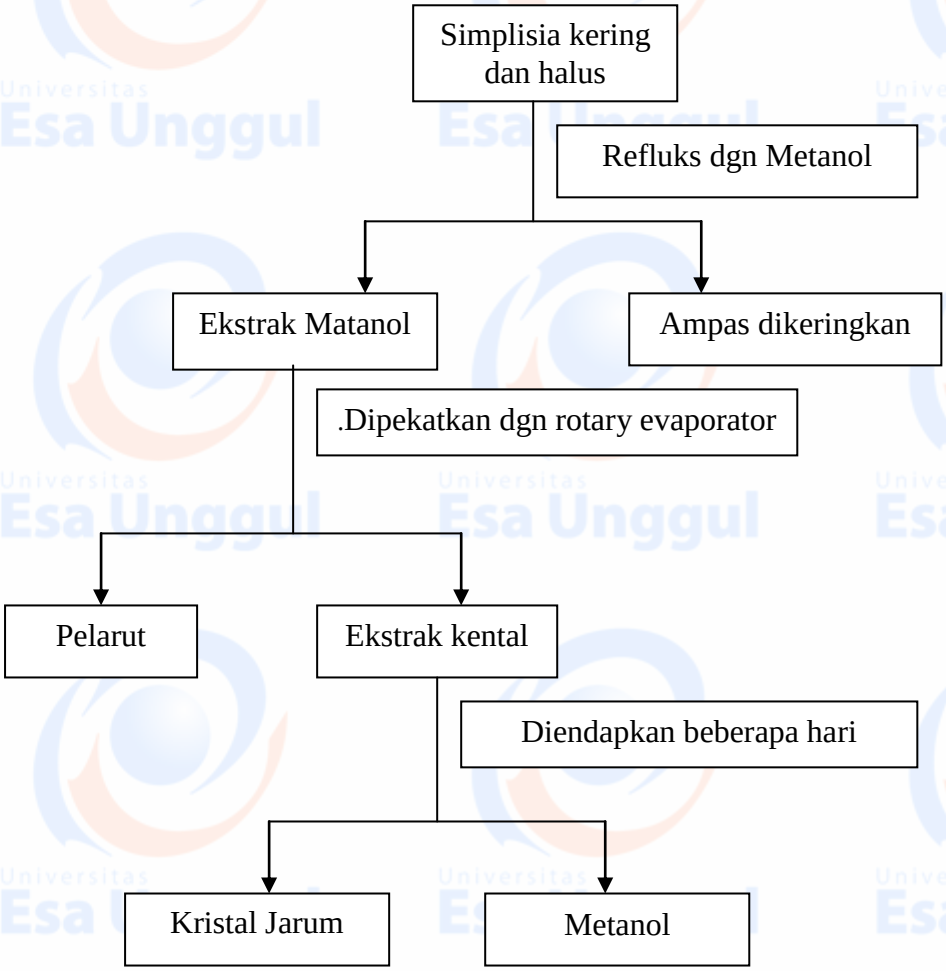
a. Tampung ekstrak kental ke dalam beacker glass dan tutup dengan alumunium foil
b. Endapkan sampai didapat kristal sebanyak-banyaknnya.
c. Setelah diperoleh kristal, cuci kristal dengan menggunakan pelarut metanol dingin, sampai kristal bebas dari zat pengotor.
d. Simpan kristal yang telah bersih dalam 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

Bagan Prosedur Isolasi Metil Sinamat dari Rimpang Kencur



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 (FI), Sirupus cinnamomi (Form.Ind.), Cinnamomi Tinctura (FI), 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, Spetrofotometer UV, Panci dan kompor, Rotary evaporator, kolom, pendingin balik, labu alas bulat, erlenmeyer, beaker glass, timbangan

Cara Kerja

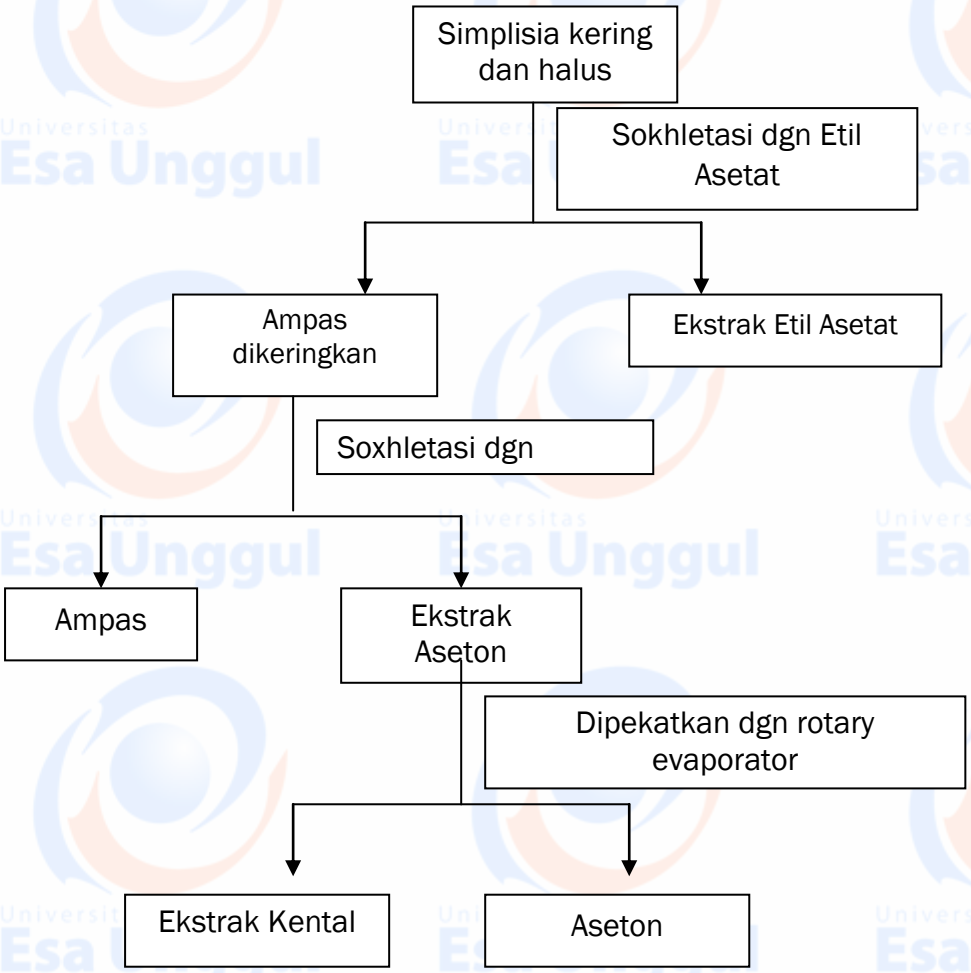
1. Isolasi

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. Masukan simplisia kedalam kantung kertas saring.
3. Kemudian masukkan kantung simplisia kedalam alat soxhlet, ekstraksi dengan pelarut etil asetat, lakukan sampai pelarut yang berada ditampungan 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 60^0C 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.

Bagan Prosedur Isolasi Kulit Kayu Manis



2. 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.

3. 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

4. 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 metanol
- Penampak noda Dragendorf

4) Cara Kerja :

a. Skrining fitokimia: lihat prosedur skrining

b. Isolasi dengan metode sokhlet

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.

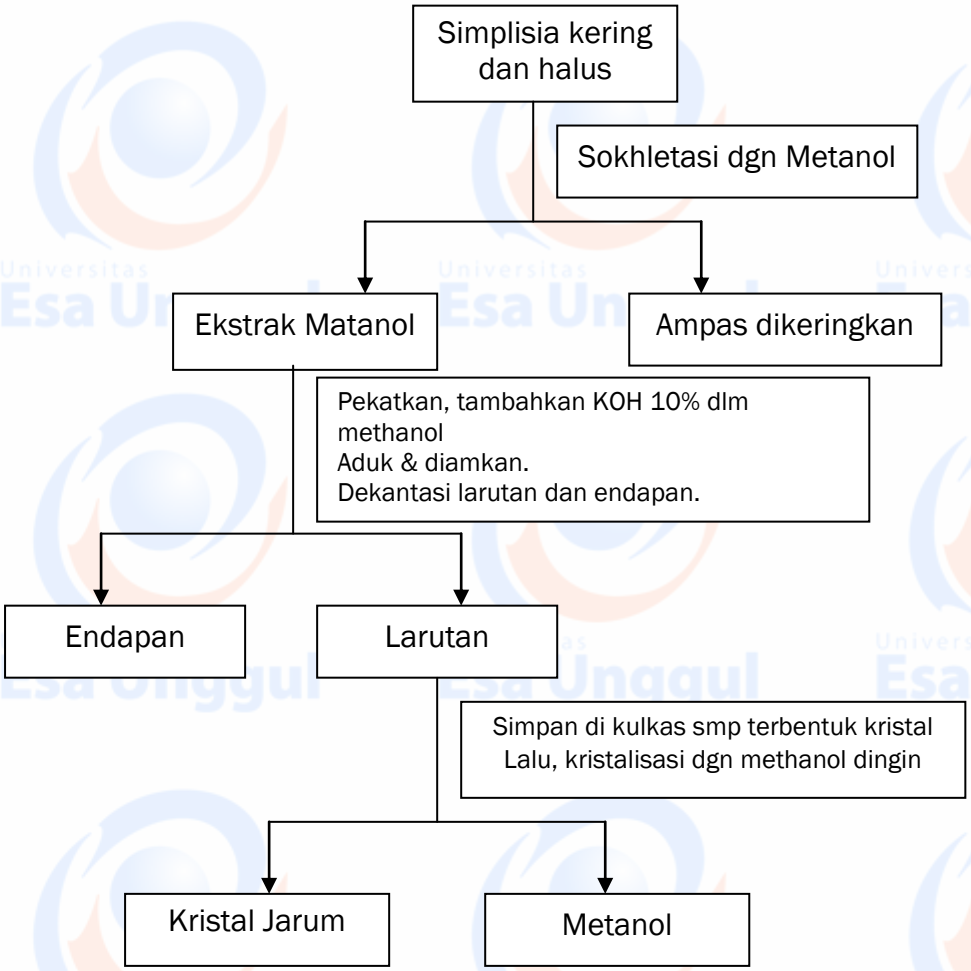
g. Lakukan pemurnian menggunakan methanol dingin, dengan cara mencuci kristal berulang kali.

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 Prosedur 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

5.2 Pemeriksaan Kimia

a. Ekstrak kental (Ekstrak + HCl 2 N)

+ Meyer

+ Dragendorf

+ Bauchardad

b. Kristal murni (Kristal + HCl 2 N)

+ Meyer

+ Dragendorf

+ Bauchardad

c. Perhitungan Rendamen:

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

5.3. Kromatografi Lapis Tipis

Eluen : Heksan : etil asetat 7:3 atau chloroform : methanol

penampak noda : UV panjang gelombang 254 nm dan 365 nm dan dragendorf

5.4. 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 H_2SO_4 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.

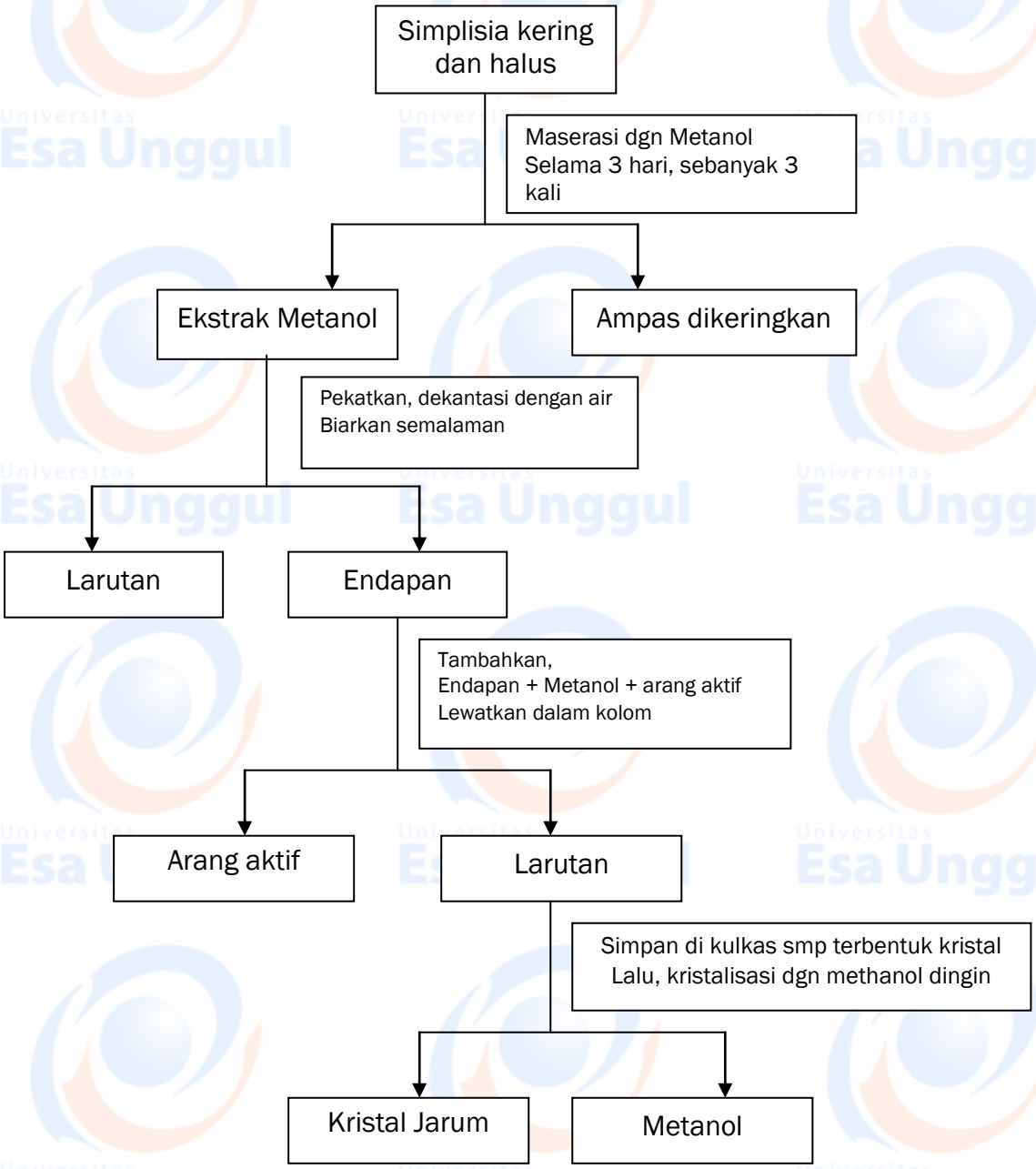
o. Lakukan pemurnian menggunakan methanol dingin, dengan cara mencuci kristal berulang kali.

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 : H2SO4 10%

Bagan Prosedur 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, HCl P,
- Logam Mg, NH_4OH, As.astetat anhidrad, Alkohol.

IV. Cara Kerja

a. Skrining Fitokimia

b. Isolasi Metoda Sokhlet

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

c. Kromatografi lapis tipis dengan berbagai eluen

d. 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 sampel

Sample dikeringkan dengan cara menambahkan silica ½ 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

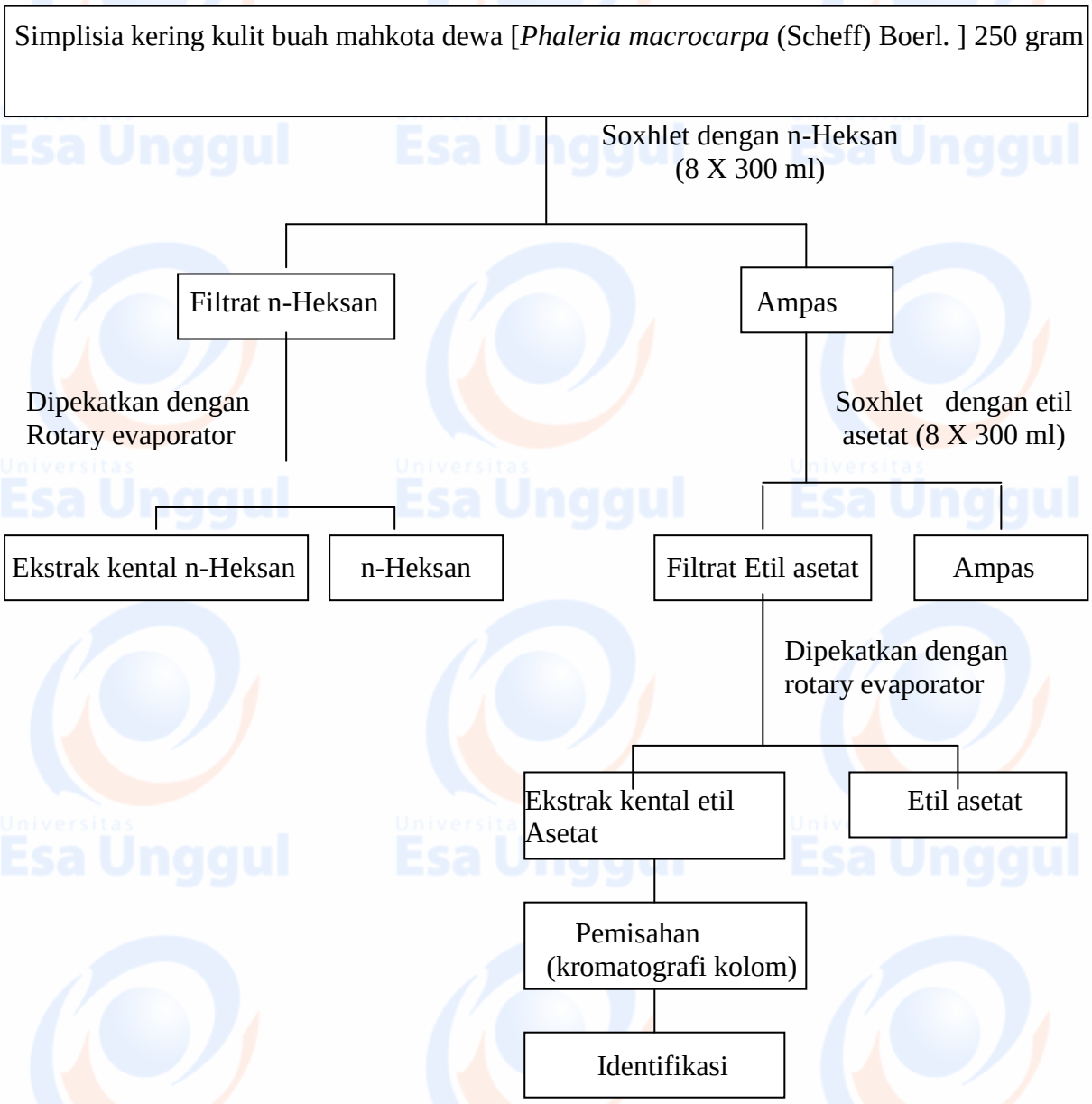
E. Persiapan botol penampung

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.

Bagan Prosedur Isolasi Kulit Buah Mahkota Dewa



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. Simpilisia Kapulaga
  2. Aqua destillata, minyak Sayur, Natrium sulfat eksikatus
  3. Hexan, Metanol, Kloroform
  4. Pereaksi mayer, deagendrof, bauchardad
  5. HCL pekat, HCL encer, NH_4OH, asam asetat anhirad, alcohol.

Cara kerja

a) Secara skrining fitokimia

b) Isolasi Minyak Atsiri Kapulaga :

1. Simpilisia kapulaga dibuat menjadi serbuk kering terlebih dahulu.
2. Timbang lebih dari 250 gram simplisia, kemuadian masukkna 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 masukkna Natrium Sulafat eksicatus kedalam vial, agar diperoleh minyak atsiri murni.
6. Identifikasi minyak atsiri : organoleptis, indeks bias, KLT

VIII. ISOLASI FLAVONOID DARI BENALU TEH *(Scrulla 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

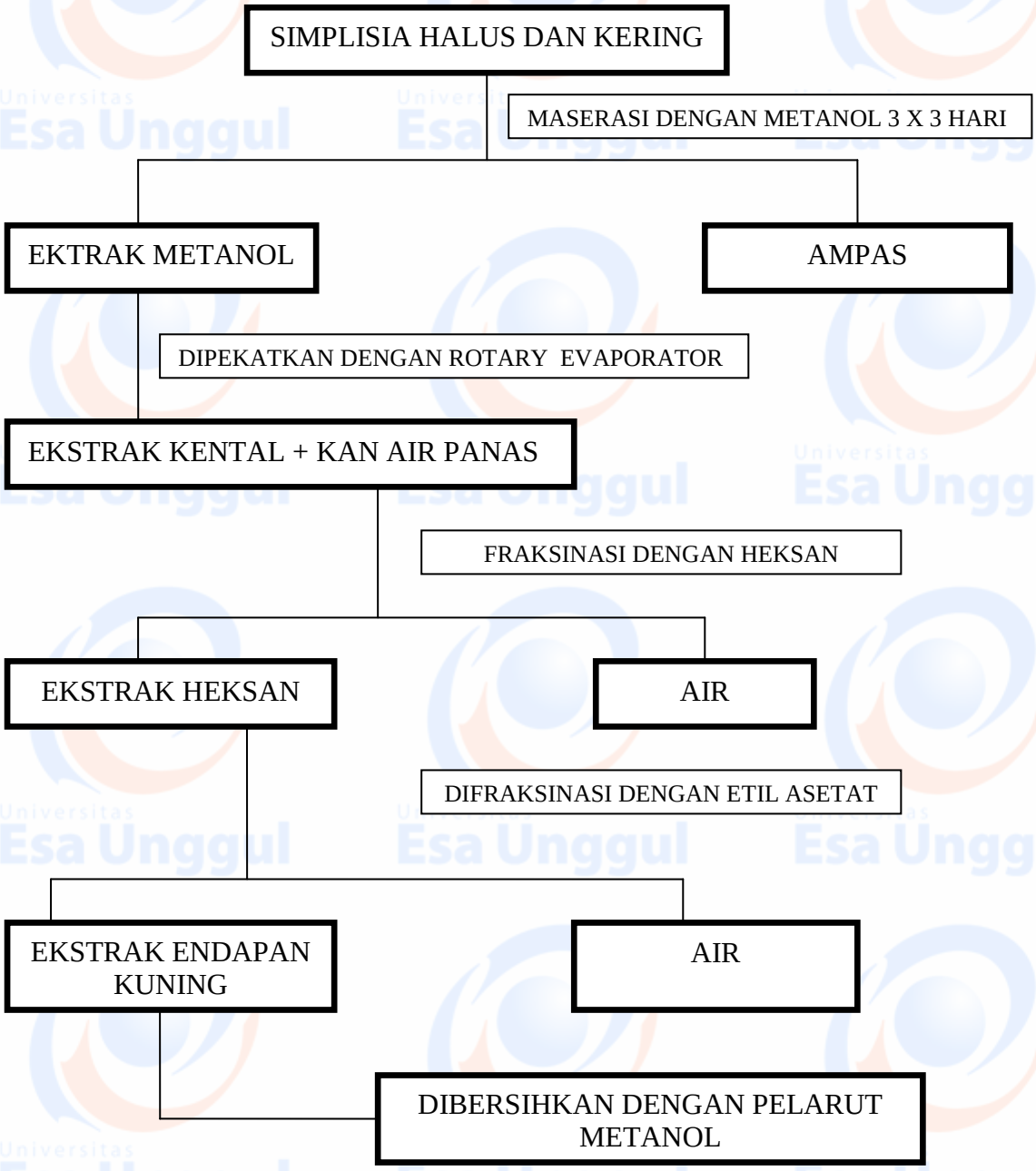
Bahan :

- Benalu teh, - Metanol, - Pelarut organik, 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 dirotary 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 TRITERPENOID DARI BIJI PEPAYA (*Carica papaya*)

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

Teori

Pepaya tergolong dalam famili Caricales, dengan morfologi 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.

Biji papaya diketahui memiliki kandungan kimia berupa asam lemak, terpenoid, flavonoid, fenol, dan saponin yang berguna sebagai Antelmentik,Antidiare,Skabisid dll.

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:

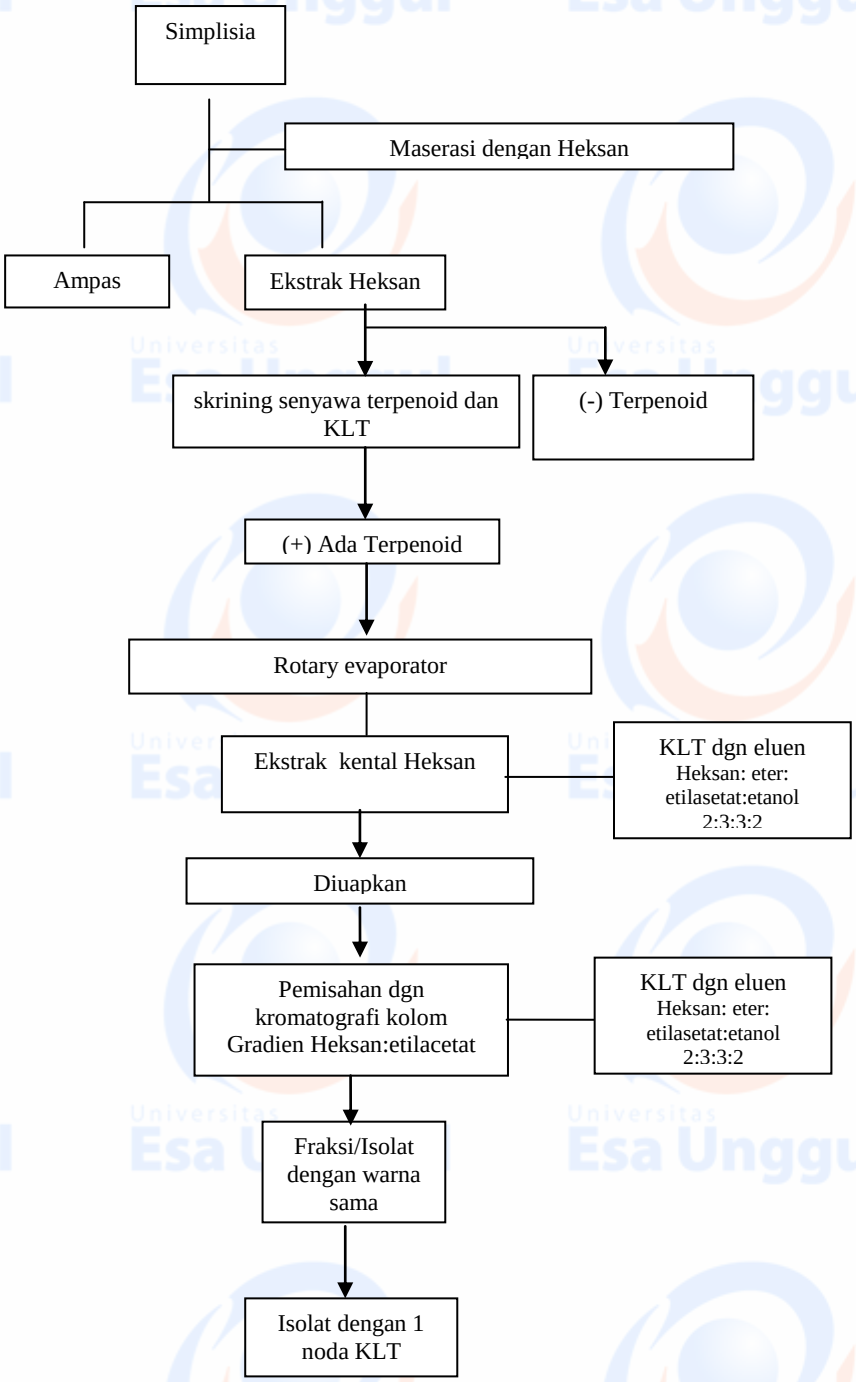
- Biji papaya
- Berbagai macam pelarut : Etanol, heksan, etilasetat dll
- Silica gel
- Berbagai reagent pereaksi

Cara kerja :

1. Biji pepaya yang berwarna putih dicelupkan kedalam etanol panas kemudian dikeringkan dan dihaluskan.
2. Sebanyak 500 g serbuk kering biji papaya diekstraksi dengan cara maserasi menggunaka pelarut n-heksana,
3. Extrak yang diperoleh diuapkan dengan rotary evaporator sehingga diperoleh extrak 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 relaif murni mengandung triterpenoid.
7. Identifikasi senyawa hasil isolasi secara psektrofotometri UV-Vis dan IR

Bagan Prosedur Ekstraksi Triterpenoid Biji Pepaya (*Carica papaya*)



X. 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

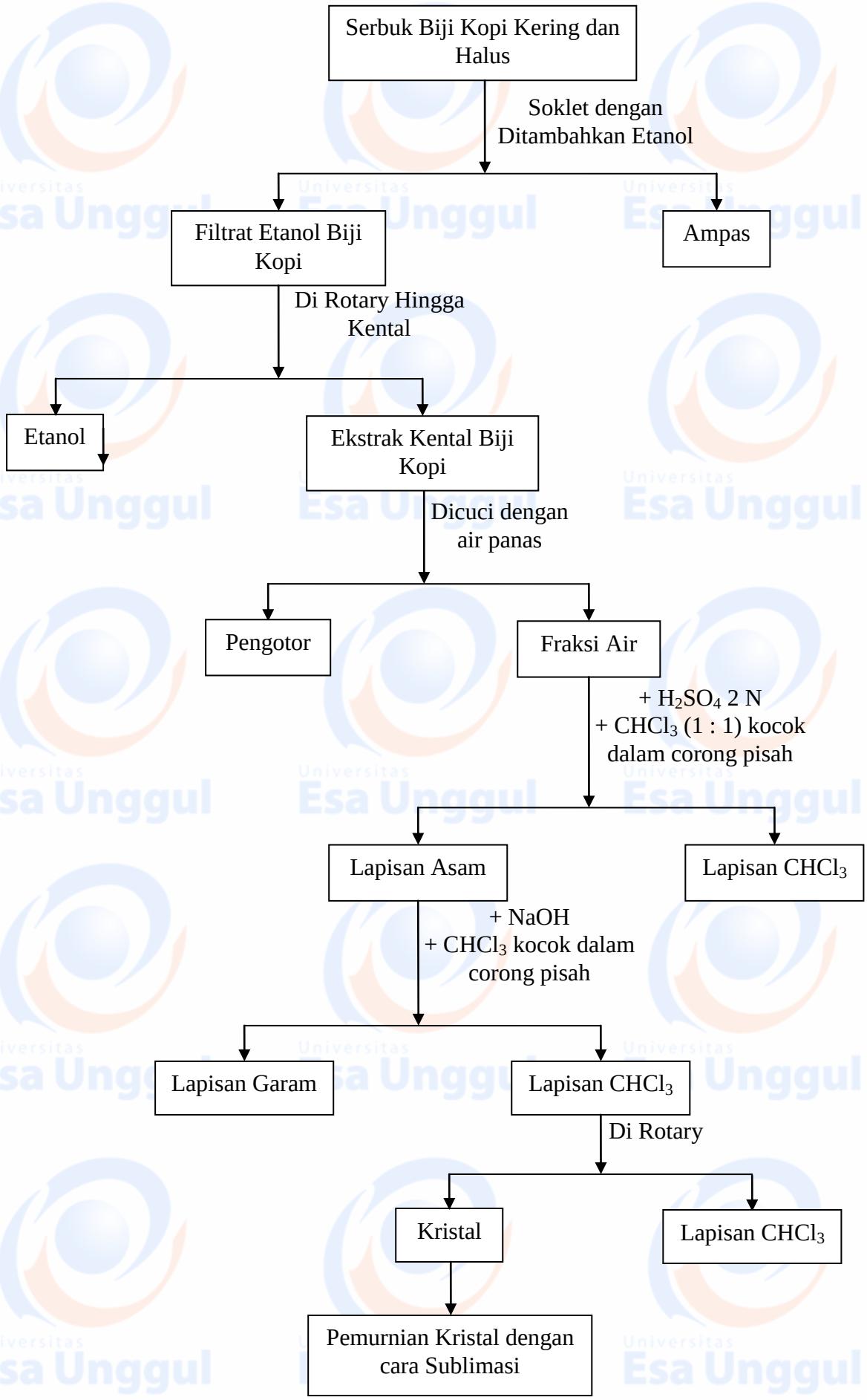
- Alat perkolasi , Rotary Evaporator
- Alat destilasi
- Plat KLT, Chamber
- Erlenmeyer, beaker glass, pipet tetes

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


Serbuk Biji Kopi Kering dan Halus
Soklet dengan Ditambahkan Etanol
Filtrat Etanol Biji Kopi
Ampas
Di Rotary Hingga Kental
Etanol
Ekstrak Kental Biji Kopi
Dicuci dengan air panas
Pengotor
Fraksi Air
+ H_2SO_4 2 N
+ $CHCl_3$ (1 : 1) kocok dalam corong pisah
Lapisan Asam
Lapisan $CHCl_3$
+ NaOH
+ $CHCl_3$ kocok dalam corong pisah
Lapisan Garam
Lapisan $CHCl_3$
Di Rotary
Kristal
Lapisan $CHCl_3$
Pemurnian Kristal dengan cara Sublimasi

XI. 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.

III. Alat Dan Bahan

Alat – Alat

- Erlemeyer
- 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
- NH_4OH 25 %
- NH_4OH 10%
- H_2SO_4 (p)
- Logam Mg
- Fehling A
- Fehling B
- Amil alkohol
- $CHCl_3$
- Aquadest
- Eluent BAA: (4:1:5)

IV. Prosedur Kerja

1. Siapkan alat dan bahan
2. Skriing bahan terlebih dahulu sebelum memulai isolasi
3. Isolasi senyawa Flavonoid

   Ekstraksi :

   500 gram serbuk kering simplisia Tempuyung yang diperoleh dari Barittro Bogaor dimaserasi dengan 1,5 L n-Heksan sambil diaduk hingga tidak diperoleh fitrat 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 ekstarak 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 no. 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. Tekhnologi Bahan Alam. Penerbit ITB Bandung.
2. Anonim, 1977. *Materia Medika Indonesia*, Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
3. Anonim, 1978. *Materia Medika Indonesia*, Jilid II. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
4. Anonim, 1979. *Materia Medika Indonesia*, Jilid III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
5. Anonim, 1980. *Materia Medika Indonesia*, Jilid IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
6. Anonim, 1989. *Materia Medika Indonesia*, Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
7. Anonim, 1995. *Materia Medika Indonesia*, Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
8. Anonim, 2008. Farmakope Herbal Indonesia, Edisi I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
9. Anonim, 2010. Suplemen I Farmakope Herbal Indonesia, Edisi I. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
10. Harbone, JB. 1987. Metode Fitokimia Penuntun cara modern menganalisa tumbuhan. ITB Bandung
11. Sekolah Farmasi ITB http://bahan-alam.fa.itb.ac.id
12. Sirait M. Penuntun Fitokimia Dalam Farmasi, 2007. Penerbit ITB Bandung
13. Soediro Iwang, 2000. Diktat Kuliah Fitokimia. Fakultas Farmasi UNTAG 1945 jakarta
14. Wiryowidagdo S, 2008. Kimia dan Farmakologi Bahan Alam. Penerbit EGC.