

2020

MODUL PRAKTIKUM KIMIA BAHAN ALAM



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
BANDUNG**

EVALUASI FITOKIMIA SIMPLISIA TUMBUHAN OBAT

Tujuan

1. Mahasiswa mampu menjelaskan tujuan penapisan/skrining fitokimia
2. Mahasiswa mampu menentukan golongan senyawa kimia apa saja yang ada dalam tumbuhan obat
3. Mahasiswa mampu menjelaskan tahap-tahap proses penapisan/skrining fitokimia untuk suatu golongan senyawa
4. Mahasiswa mampu menjelaskan reaksi yang terjadi pada proses penapisan fitokimia suatu golongan senyawa.

Teori

Tumbuhan obat adalah tumbuhan atau bagian-bagiannya yang digunakan untuk pencegahan penyakit ataupun untuk mengobati penyakit-penyakit tertentu, baik atas dasar penggunaan empiris ataupun atas dasar pengujian ilmiah melalui uji pra klinik hingga uji klinik.

Khasiat atau aktivitas farmakologi yang menjadi tumpuan bagi penggunaan suatu tumbuhan sebagai tumbuhan obat ditentukan oleh senyawa kimia metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan tersebut. Kandungan senyawa metabolit sekunder yang mempunyai arti penting dalam kaitan dengan khasiat atau aktivitas farmakologi tumbuhan obat adalah senyawa metabolit sekunder kelompok alkaloid, tannin dan polifenol, mono dan seskuiterpen, senyawa kuinon, glikosida jantung, flavonoid, triterpenoid dan steroid, serta saponin.

Uji fitokimia terhadap kandungan senyawa kimia metabolit sekunder merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian mengenai tumbuhan obat atau dalam hal pencarian senyawa baru yang berasal dari bahan alam. Oleh karenanya, metode uji fitokimia harus merupakan uji yang sederhana tetapi terandalkan. Metode uji fitokimia yang banyak digunakan adalah metode reaksi warna dan pengendapan yang dapat dilakukan di lapangan ataupun laboratorium.

Metode evaluasi fitokimia pada dasarnya terdiri dari tiga bagian, yaitu evaluasi mikrokimia, skrining fitokimia, dan pencarian senyawa identitas melalui analisis kromatografi.

Analisis mikrokimia merupakan analisis pengenalan dasar adanya kandungan kimia tertentu dalam simplisia. Analisis ini menjadi penunjang bagi skrining fitokimia yang lebih terarah dalam pengenalan atau dugaan kandungan kimia dalam simplisia.

Skrining fitokimia, meliputi:

1. Senyawa alkaloid

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder yang dalam struktur molekulnya terdapat atom nitrogen (umumnya heterosiklik). Adanya pasangan electron bebas dalam atom nitrogen ini menyebabkan alkaloid dapat membentuk kompleks yang tidak larut dalam logam-logam berat. Fenomena ini merupakan dasar bagi reaksi pengenalan adanya alkaloid dalam simplisia tumbuhan obat.

Alkaloid adalah kelompok atau golongan senyawa kimia metabolit sekunder asal tumbuhan atau hewan yang dalam strukturnya mempunyai atom nitrogen, bersifat basa, serta mempunyai aktivitas fisiologis tertentu. Berdasarkan biosintesisnya, alkaloid terdiri atas:

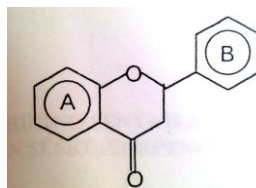
- a. True alkaloid, berasal dari asam amino. Bersifat basa, umumnya mempunyai atom nitrogen dalam lingkaran heterosiklik.
- b. Proto alkaloid, merupakan amina yang relative sederhana dengan atom nitrogen yang tidak terdapat dalam lingkaran heterosiklik (efedrin).
- c. Pseudo alkaloid, biosintesisnya tidak berasal dari asam amino (kafein).

Umumnya alkaloid bersifat basa karena adanya pasangan electron bebas pada atom nitrogennya. Dalam tumbuhan, biasanya alkaloid terdapat dalam bentuk garam (tartrat, laktat, sitrat). Sifat kimia alkaloid ini merupakan dasar bagi cara isolasi maupun pengenalannya. Pengenalan alkaloid didasarkan pada kemampuannya membentuk senyawa kompleks tidak larut dengan pereaksi-pereaksi yang mengandung logam berat, misalnya pereaksi mayer (mengandung kalium ioda dan raksa (II) klorida), pereaksi dragen dorff (mengandung bismuth subnitrat dan raksa (II) klorida).

Walaupun reaksi pengenalan alkaloid dengan kedua pereaksi tersebut merupakan reaksi pengenalan umum, tetapi beberapa senyawa non alkaloid juga dapat mengendap dengan pereaksi tersebut, misalnya protein, kumarin, hidroksi flavon, serta tannin. Reaksi pengenalan palsu tersebut dikenal dengtean sebutan reaksi positif palsu (*true false positive*). Perlu menjadi perhatian, selain adanya reaksi positif palsu, dengan metode ini senyawa alkaloid kuartener dalam simplisia tidak dapat diubah menjadi alkaloid bentuk basa dan akan tetap tinggal dalam sel, sehingga tidak dapat dikenal dengan metode pengendapan oleh pereaksi-pereaksi tersebut di atas. Keadaan seperti ini disebut sebagai reaksi negative palsu (*true false negative*).

2. Skrining senyawa flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang memberikan berbagai warna pada tumbuhan. Flavonoid mempunyai struktur yang sangat bervariasi, namun pada umumnya flavonoid mempunyai struktur dasar:



Pengenalan flavonoid didasarkan pada reaksi reduksi gugusan karbonil pada lingkaran δ -lakton menjadi gugusan alkohol membentuk senyawa hidroksi yang berwarna-warni tergantung pada gugusan fungsional yang terikat pada lingkaran A atau B. Warna yang terjadi dapat ditarik oleh amil alkohol.

3. Skrining senyawa tannin dan polifenol

Tannin dan senyawa polifenolat alam mudah dikenali melalui pengenalan gugusan fenol yang dapat memberikan warna biru-hitam dengan pereaksi besi (III) klorida. Untuk membedakan tannin dengan polifenolat alam, digunakan sifat tannin yang dapat mengendapkan larutan gelatin 1%.

4. Skrining senyawa saponin

Saponin adalah senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan yang bersifat dapat membentuk busa, serta dapat menghemolisis sel darah merah. Struktur kimia umumnya merupakan glikosida, yang bila dihidrolisis akan menghasilkan bagian glikon (senyawa gula) dan aglikon (senyawa non gula). Struktur aglikon saponin umumnya merupakan struktur triterpenoid dan

struktur steroid, sehingga ditinjau dari strukturnya, saponin dapat dipilah atas saponin triterpenoid dan saponin steroid. Reaksi pengenalan saponin didasarkan pada sifatnya yang mampu memberikan busa pada pengocokan dan persistein pada penambahan sedikit asam atau pada pendiaman.

5. Skrining senyawa moodan seskuiterpen

Monoterpen dan seskuiterpen adalah senyawa-senyawa C10 – C15 yang tersusun dari unit isopren C₅H₈ sebagai penyusunnya. Senyawa monoterpen dan seskuiterpen ini merupakan komponen-komponen penyusun minyak atsiri. Reaksi pengenalan berdasarkan pada kemampuannya membentuk warna-warna dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat atau pereaksi vanillin asam-sulfat.

6. Skrining senyawa steroid dan triterpenoid

Senyawa kelompok steroid dan triterpenoid adalah senyawa kelompok metabolit sekunder yang mempunyai struktur dasar yang hamper sama. Pengenalan senyawa triterpenoid dan steroid didasarkan pada kemampuannya membentuk warna dengan pereaksi Libermann-Burchard.

7. Skrining senyawa kuinon

Senyawa kuinon umumnya merupakan turunan para benzokuinon. Pengenalan senyawa ini didasarkan pada kemampuannya membentuk garam berwarna antara hidrokuinon dengan larutan alkali kuat (NaOH atau KOH).

Pustaka

Marini, C.P., 1981, *Plant Screening by Chemical and Chromatography Procedure in the Field Condition*, J.Chromatogr, 213 : 117 – 122.

Prosedur

Golongan	Prosedur	Hasil
alkaloid	Serbuk simplisia ditambahkan asam klorida kemudian disaring, filtrat yang dihasilkan dibasakan dengan ammonia dan ditambahkan kloroform. Bagian kloroform diuapkan dan residunya diasamkan dengan asam klorida 2 N,	

	larutan asam dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama direaksikan dengan pereaksi Dragendorff dan jika dihasilkan endapan berwarna jingga, simplisia diduga mengandung alkaloid. Larutan kemudian disaring dan filtratnya diteteskan pada kertas natrium hidroksida (kertas saring yang telah dibasahi larutan natrium hidroksida lalu dikeringkan). Setelah itu kertas natrium hidroksida diamati di bawah sinar UV 366 nm. Bila tidak ada pendaran kuning-kehijauan maka simplisia positif mengandung alkaloid dan tidak mengandung kumarin. Bagian kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Bila muncul endapan putih, simplisia diduga mengandung alkaloid. Uji dilakukan dengan penambahan etanol 95%. Bila endapan putih melarut, terdapat alkaloid dalam simplisia. Bila endapan tidak melarut setelah penambahan etanol 95%, simplisia mengandung protein dan tidak mengandung alkaloid (Fransworth, 1966).	
Fenolat	Serbuk simplisia dididihkan dalam air dan disaring. Filtrat direaksikan dengan larutan besi (III) klorida. Apabila terjadi perubahan warna yang dinilai terhadap blangko, simplisia mengandung senyawa golongan fenol.	
Tannin	Serbuk simplisia dididihkan dalam air, kemudian disaring. Filtrat dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Filtrat pada tabung pertama ditambahkan larutan gelatin. Bila gelatin mengendap artinya terdapat tanin dalam simplisia tersebut, bila tidak	

	ada endapan maka tidak perlu dilakukan uji lanjutan pada tabung kedua. Tabung kedua, filtrat ditambahkan pereaksi Steasny. Apabila terbentuk endapan merah muda, artinya terdapat tanin katekat. Larutan disaring, pada filtrat ditambahkan natruim asetat dan besi (III) klorida. Jika muncul warna biru tinta maka terdapat tanin galat.	
Flavonoid	Serbuk simplisia dididihkan dalam air kemudian disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk magnesium, beberapa tetes asam klorida pekat, dan amil alkohol. Campuran dikocok dan dilihat apakah terjadi perubahan warna pada lapisan amil alkohol. Bila terdapat perubahan warna, simplisia positif mengandung flavonoid. Perubahan warna dinilai terhadap blangko (Fransworth, 1966).	
Monoterpen dan seskuiterpen	Serbuk simplisia digerus dengan eter, kemudian fase eter diuapkan dalam cawan penguap hingga kering, pada residu ditetesi pereaksi larutan vanillin sulfat. Terbentuknya warna-warni menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan sesquiterpen	
Steroid dan triterpenoid	Serbuk simplisia direndam dalam n-heksan, disaring, dan filtratnya diuapkan hingga didapat residu. Residu ditambahkan preaksi Libermann-Burchard. Bila muncul warna biru-hijau maka simplisia mengandung steroid dengan kadar yang lebih tinggi dari triterpenoid. Sedangkan bila muncul warna merah-ungu artinya simplisia mengandung senyawa triterpenoid dengan kadar	

	lebih tinggi dari steroid	
Kuinon	Serbuk simplisia dididihkan dalam air kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan natrium hidroksida dan bila muncul warna merah, simplisia mengandung kuinon. Untuk menghindari hasil reaksi positif palsu kuinon oleh flavonoid, fase air dari penapisan flavonoid diambil dan ditambahkan larutan natrium hidroksida. Bila terjadi perubahan warna menjadi merah, simplisia mengandung kuinon. Untuk menghindari reaksi positif palsu kuinon oleh tanin katekat, filtrat uji tannin setelah ditambahkan gelatin ditambahkan larutan natrium hidroksida. Bila warna menjadi merah, simplisia mengandung kuinon.	
Saponin	Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas. Setelah itu didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Diamati apakah terbentuk buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Buih yang dihasilkan oleh saponin tetap ada pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N (Depkes RI, 1995).	

Kesimpulan:

Tugas

Jelaskan tujuan tahapan prosedur yang dilakukan pada skrining fitokimia tersebut diatas? (misalnya : mengapa/apa tujuan ditamhakkannya kloroform terhadap simplisia pada uji alkaloid, apa tujuan penambahan serbuk Mg, dsb).

EKSTRAKSI METABOLIT SEKUNDER DARI SIMPLISIA TUMBUHAN OBAT

Tujuan

1. Mahasiswa mampu menjelaskan proses yang terjadi pada masing-masing metoda ekstraksi
2. Mahasiswa mampu menjelaskan alasan pemilihan metode ekstraksi
3. Mahasiswa mampu menjelaskan alasan pemilihan pelarut pengekstraksi
4. Mahasiswa mampu melakukan proses ekstraksi simplisia

Teori

Ekstraksi merupakan metode pengambilan senyawa metabolit sekunder, termasuk alkaloid, dari simplisia tumbuhan obat dengan bantuan pelarut tertentu. Tujuan ekstraksi sedikit atau banyak mempengaruhi cara ekstraksi kita dan alat uji yang akan dipakai untuk pemantauan proses ekstraksi, jenis dan sifat senyawa yang akan diisolasi menentukan pelarut yang akan digunakan. Jika tujuan kita mengisolasi senyawa yang mempunyai aktifitas biologi misalnya untuk dijadikan obat, sebaiknya ekstraksi dan fraksinasi dituntut dan dipantau dengan cara uji biologi, hanya ekstrak dan fraksi yang menunjukkan aktivitas biologi yang memenuhi kriteria saja yang dikerjakan lebih lanjut. Jika tujuan ekstraksi untuk mengisolasi senyawa atau golongan senyawa tertentu misalnya alkaloid, terpenoid, kumarin, flavonoid, ekstraksi dan fraksinasi harus dituntut dan dipantau dengan uji kimia dan uji lain (metode hifenasi atau gabungan dua metode misalnya kromatografi cair-spektrofotometri ultra violet, kromatografi cair-spektrofotometri inframerah, kromatografi cair-spektrofotometri resonansi magnet inti).

Dalam memilih pelarut yang akan dipakai, harus memperhatikan sifat kandungan kimia (metabolit sekunder) yang akan diisolasi. Sifat yang penting yang harus diperhatikan ialah sifat kepolaran yang dapat dilihat dari senyawa tersebut/gugus polar pada senyawa tersebut. Dengan mengetahui sifat metabolit yang akan diekstraksi kita dapat memilih pelarut yang sesuai, berpedoman pada kenyataan : senyawa polar lebih mudah larut dalam pelarut polar dan senyawa non

polar lebih mudah larut dalam pelarut non polar. Mengenai kepolaran harus diingat ialah derajat kepolaran yang bergantung pada tetapan dielektrik, makin besar tetapan dielektrik, makin polar pelarut tersebut.

Pada prakteknya, dalam satu ekstraksi sering digunakan pelarut dalam gradasi kepolaran, mulai dari non polar, semi polar, hingga pelarut polar. Dengan demikian akan diperoleh ekstrak awal (crude ekstrak) yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar dan senyawa polar. Pengekstraksian dengan pelarut non polar biasanya diperlukan juga untuk pengawaleman (defatting) sebelum ekstraksi dengan pelarut yang sesuai. Dengan demikian ekstrak yang diperoleh bersifat bebas lemak. Contoh pelarut polar adalah air, metanol, etanol; pelarut semi polar misalnya aseton, etil asetat; serta pelarut non polar yang umum digunakan adalah n-heksan, eter minyak tanah, kloroform dan diklormetan. Dalam pustaka-pustaka sering dinyatakan ekstraksi dengan benzene atau kloroform atau karbon tetraklorida sebagai pelarut non polar, tetapi kini mulai ditinggalkan karena sifat hepatotoksiknya yang tinggi.

Ekstraksi dapat dipilih menjadi beberapa jenis tergantung pada berbagai keadaan yang menyertainya, misalnya:

- a. Ditinjau dari suhu yang menyertai prosesnya, ekstraksi terbagi atas:
 1. Ekstraksi dingin, misalnya maserasi, perkolasi. Untuk senyawa yang tidak tahan panas (termolabil), tetapi memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan metode ekstraksi panas.
 2. Ekstraksi panas, misalnya infundasi, ekstraksi dengan alat soklet. Untuk senyawa tahan panas (termostabil), waktu ekstraksi lebih cepat karena pemanasan akan memperbesar kelarutan.Jika ingin aman untuk mencegah terbentuknya senyawa jadian atau penguraian lebih baik menggunakan cara ekstraksi dingin.
- b. Ditinjau dari banyaknya ulangan proses, ekstraksi terbagi atas:
 1. Ekstraksi satu kali
 2. Ekstraksi berulang kali

Dalam hal ini efektivitas proses ekstraksi akan ditentukan oleh banyaknya pengulangan proses ekstraksi. Ekstraksi berulang kali akan lebih efektif dibandingkan dengan ekstraksi satu kali.

Pelarut organik atau pelarut air yang digunakan pada ekstraksi harus dihilangkan atau diperkecil volumenya, hingga diperoleh ekstrak pekat. Untuk pelarut organik dapat dilakukan dengan penguap putar vakum. Untuk menghilangkan pelarut air biasanya dilakukan pengering bekuan (*freezedrying*).

Ekstrak yang pekat mungkin mengkristal pada pendinginan atau bila dibiarkan. Terhadap Kristal dapat dilakukan pengujian kemurnian, apakah Kristal tersebut merupakan senyawa tunggal atau bukan. Untuk Kristal yang merupakan senyawa tunggal dapat dilakukan pemurnian dengan metode rekristalisasi.

Pustaka

Harborne, J.B, 1987, Metoda Fitokimia, terjemahan Kosasih P, terbitan kedua, Penerbit ITB, Bandung.

Data percobaan

1. Ekstraksi

Berat simplisia :..... gram

Metode ekstraksi :.....

Alasan :.....

.....

.....

Berat ekstrak kental:..... gram

Rendemen : %

2. Bobot jenis ekstrak

Berat pikno kosong :..... gram

Berat pikno + air :..... gram

Volume pikno :..... ml

Berat air :..... gram

Kerapatan air :..... gram/ml

Berat pikno + ekstrak cair :..... gram

Berat ekstrak cair :..... gram

Kerapatan ekstrak :..... gram/ml

Bobot jenis ekstrak :.....

3. Dinamolisa ekstrak

Dengan menggunakan maserat awal dilakukan dinamolisa dengan cara sebagai berikut:

Kertas saring whatman diameter 10 cm, pada bagian pusat dilubangi kemudian dipasang sumbu yang terbuat dari kertas saring. Kertas saring bersumbu kemudian ditutupkan pada cawan petri yang berisi maserat. Biarkan terjadi proses difusi sirkular selama beberapa saat. Gambaran dinamolisa diamati.

Pola dinamolisa ekstrak

Kesimpulan:

Tugas

1. Apa kegunaan perhitungan rendemen dihubungkan dengan proses pengujian farmakologi dan proses produksi?
2. Apa kegunaan dilakukannya proses dinamolisa?
- 3.

FRAKSINASI EKSTRAK

Tujuan

1. Mahasiswa mampu menjelaskan tujuan fraksinasi
2. Mahasiswa mampu menjelaskan macam-macam metode fraksinasi
3. Mahasiswa mampu menjelaskan mekanisme/proses yang terjadi pada ECC, KCV, kromatografi kolom klasik, dan KLT
4. Mahasiswa mampu melakukan fraksinasi dengan metoda ECC, KCV dan KLT.

Teori

Tahapan fraksinasi, pemisahan dan pemurnian dapat dilakukan dengan macam-macam teknik yang diantaranya adalah dengan metode kromatografi ataupun kombinasi kromatografi dengan metode ini. Kadang-kadang satu kali saja dilakukan fraksinasi, misalnya dengan fraksinasi menggunakan teknik ekstraksi cair-cair, dapat diperoleh suatu senyawa dengan jumlah yang cukup besar yang selanjutnya tinggal dilakukan tahap pemurnian, misalnya dengan rekristalisasi yang sederhana. Tapi dalam kenyataannya, sering kali diperlukan fraksinasi yang berulang-ulang, baik dengan teknik yang sama ataupun kombinasi dengan teknik fraksinasi lainnya.

Metode pemisahan yang banyak digunakan adalah:

1. Ekstraksi cair-cair (ECC)
Dalam proses ekstraksi terjadi perpindahan solute dari satu fase ke fase yang lain. Pada ekstraksi cair-cair, fase yang digunakan adalah dua cairan yang tidak saling bercampur, biasanya digunakan air dan pelarut organik.
2. Kromatografi, teknik kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kertas (KKt), kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi gas-cair (KGC) dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).
Pada kromatografi dibedakan istilah pengembangan dan elusi. Istilah pengembangan digunakan untuk kromatografi datar yang fasa geraknya berjalan melalui fasa diam tanpa terjadi pengeluaran senyawa dari fasa

diamnya. Istilah ini digunakan pada kromatografi datar seperti kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis (KLT). Istilah elusi digunakan melalui fasa diam sambil membawa senyawa ke luar dari fasa diam. Istilah ini digunakan pada kromatografi kolom.

Kromatografi cair vakum (KCV)

Pemakaian utama KCV adalah untuk fraksinasi atau penyederhanaan komponen ekstrak, meskipun dari pengalaman sering diperoleh langsung senyawa tunggal dalam bentuk Kristal. Prinsip dasar KCV adalah meningkatkan laju aliran dengan mengurangi tekanan di dalam labu penampung fraksi, sedangkan tekanan di atas kolom adalah tekanan atmosfer biasa (bukan diberi tekanan khusus).

Kolom kromatografi dikemas kering (biasanya dengan penyerap KLT 10-40 μm) dengan menggunakan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap lalu divakum lagi, kolom dihisap sampai kering dan sekarang siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang cocok dimasukkan langsung pada bagian atas kolom atau dicampur dulu dengan penyerap yang sama atau pra penyerap seperti celite, tanah diatomae dan dihisap ke dalam kemasan perlahan-lahan dengan memvakumnya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah dan kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan sambil kolom dihisap sampai kering untuk setiap fraksinya. Fraksi-fraksi yang didapat bias digunakan atau dianalisis lebih lanjut.

Kromatografi lapis tipis (KLT)

KLT (Kromatografi Lapis Tipis) merupakan salah satu metode kromatografi, yaitu suatu teknik atau metode pemisahan/pemurnian senyawa kimia berdasarkan pada perbedaan koefisien partisi senyawa dalam fasa diam dan fasa gerak, atau berdasarkan daya adsorpsi senyawa pada adsorben yang bertindak sebagai fasa diam. Fasa diam adalah fasa yang terikat pada pendukung, sedangkan fasa gerak adalah fasa yang bergerak melalui fasa diam.

Senyawa yang akan dipisahkan ikut bergerak bersama fasa gerak. Selama senyawa bergerak terjadi proses partisi komponen di antara fasa gerak dan fasa

diam, atau terjadi proses adsorpsi senyawa oleh adsorben yang bertindak sebagai fasa diam. Akibat adanya perbedaan koefisien partisi dan/atau afinitas adsorpsi, terjadilah perbedaan kecepatan gerakan senyawa-senyawa yang menyebabkan terjadinya pemisahan.

Berbagai adsorben dapat digunakan pada KLT, namun yang paling umum digunakan adalah silica gel, alumina, kieselguhr (tanah diatomae) dan selulosa. Pemilihan adsorben untuk suatu pemisahan KLT selain mempertimbangkan sifat kimia senyawa sifat kimia adsorben, juga harus diperhatikan tingkat/derajat aktif adsorbennya. Menurut Brockmann, derajat aktif adsorben ini dapat dilihat dari kandungan air dalam adsorben tersebut. Adsorben dengan kandungan air paling rendah merupakan adsorben yang mempunyai derajat aktif tertinggi.

Penggunaan kualitatif KLT didasarkan pada nilai R_f , merupakan ukuran relative letak suatu bercak senyawa dalam kromatografi terhadap garis akhir pergerakan fase gerak.

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Berbeda dengan kromatografi kertas, keterulangan (reproduksibilitas) nilai R_f pada KLT sangat tidak dapat diharapkan karena berbagai faktor penyebab seperti misalnya derajat aktif adsorben, kejenuhan tabung pengembang, kondisi pengembang, homogenitas adsorben, suhu dan lain-lain.

Prosedur

1. Kromatografi cair vakum (KCV)

- a) Rangkai alat kromatografi cair vakum.
- b) Masukkan silica gel pada kolom kaca yang dihisap dengan pompa vakum setinggi 2,5-3 cm, permukaan fasa diam diratakan.
- c) Ekstrak yang akan difraksinasi di keringkan dengan cara digerus bersamaan dengan silica gel (1:1).
- d) Taburkan diatas permukaan kolom dengan ketebalan setipis mungkin dan ditutupi kertas saring.
- e) Elusi dengan menggunakan campuran pelarut non polar : polar dengan berbagai tingkat perbandingan (0:0, 9:1, 8:2,..., 0:10) masing-masing sebanyak 50 ml.

- f) Fraksi ditampung setiap 50 ml
- g) Masing-masing fraksi kemudian di kromatografi lapis tipis.

Contoh komposisi larutan eluen yang digunakan:

Non polar (ml)	Polar (ml)
50	0
45	5
40	10
35	15
30	20
25	25
20	30
15	35
10	40
5	45
0	50

2. Kromatografi lapis tipis (KLT)

- a) Siapkan chamber pengembang kromatografi lapis tipis yang berisi campuran larutan pengembang. Biarkan hingga bagian dalam tangki pengembang jenuh dengan uap larutan.
- b) Siapkan lempeng kromatografi lapis tipis pra lapis dengan penyerap silica gel GF 254.
- c) Tandai batas bawah (garis awal) pada lempeng kromatografi dengan jarak kurang lebih 0,5-1 cm dari tepi bawah lempeng. Garis ini merupakan garis tempat penotolan.
- d) Totolkan ekstrak/ fraksi pada garis awal, biarkan kering. Penotolan dilakukan berulang pada tempat yang sama untuk memperoleh kadar senyawa yang diperkirakan cukup.
- e) Masukkan lempeng secara hati-hati dan tegak lurus ke dalam chamber pengembang yang berisi larutan pengembang. Pastikan bahwa garis awal tidak terendam oleh larutan pengembang. Biarkan terjadi proses

pengembangan selama beberapa saat hingga larutan pengembang mencapai batas rambat lebih kurang 0,5-1 cm dari tepi atas lempeng.

- f) Angkat lempeng, keluarkan dari chamber pengembang, biarkan mongering di udara terbuka, setelah kering diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Tandai bercak yang teramati. Setelah itu lempeng disemprot dengan penampak bercak asam sulfat pekat 10% dalam methanol. Amati warna dan jumlah bercak. Bandingkan dengan jumlah bercak yang teramati pada penyinaran dengan sinar UV.
- g) Tetapkan nilai Rf dari bercak yang teramati dengan cara mengukur jarak rambat bercak dan bandingkan dengan jarak rambat larutan pengembang.
- h) Fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama digabungkan.

Pustaka

Gritter, R. J; Bobbit, J. M; Schwarting, A. E, 1991, Pengantar Kromatografi, Edisi ke 2, Penerbit ITB, Bandung.

Harborne, J.B, 1987, Metoda Fitokimia, terjemahan Kosasih P, terbitan kedua, Penerbit ITB, Bandung.

Data percobaan

1. Kromatografi cair vakum (KCV)

Pelarut (fase gerak) yang digunakan :.....

Alasan :.....

.....

.....

.....

Fase diam yang digunakan :.....

Tinggi fase diam :.....

Jumlah ekstrak :.....

Hasil

Fraksi	Warna	Fraksi	Warna

2. Karomatografi lapis tipis (KLT)

Ukuran lempeng :.....

Pengembang :.....

Jarak rambat fase gerak :.....

Penampak bercak : sinar UV (254 nm dan 366 nm) dan larutan asam sulfat pekat 10 % dalam methanol

Hasil

No fraksi	Nilai Rf dengan penampak bercak			Rf	No fraksi	Nilai Rf dengan penampak bercak			Rf
	UV 254 nm	UV 366 nm	Asam sulfat			UV 254 nm	UV 366 nm	Asam sulfat	

Pola Kromatografi

Fraksi yang digabungkan

Tugas

1. Berikan beberapa contoh pelarut dengan derajat kepolaran relatif polar, semipolar dan nonpolar?
2. Mengapa proses fraksinasi/proses elusi dilakukan dengan pelarut/perbandingan pelarut dimulai dari yang relatif nonpolar?
3. Mengapa chamber perlu dijenuhkan terlebih dahulu?
4. Adakah hubungan nilai R_f dengan polaritas senyawa dalam cuplikan sampel?

PEMURNIAN, KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI

Tujuan

1. Mampu menjelaskan tujuan pemurnian
2. Mampu menjelaskan macam-macam metode pemurnian
3. Mampu menjelaskan mekanisme/proses yang terjadi pada masing-masing metode pemurnian
4. Mampu melakukan pemurnian
5. Mampu menjelaskan macam-macam metode yang digunakan untuk uji kemurnian
6. Mampu melakukan uji kemurnian

Teori

Pemurnian adalah tahap paling menentukan dalam isolasi suatu senyawa. Pemurnian bias dilakukan dengan bermacam-macam teknik yang diantaranya dengan metode kromatografi, ataupun kombinasi kromatografi dengan metode lain. Kadang-kadang dengan melakukan satu kali saja pemurnian dengan kromatografi menggunakan teknik kromatografi kolom dapat diperoleh suatu senyawa yang cukup murni, tetapi dalam kenyataannya yang lebih sering kita harus sabar, artinya memerlukan proses yang berulang-ulang baik dengan satu teknik yang sama atau kombinasi dengan teknik yang lain.

Pada identifikasi suatu kandungan tumbuhan, setelah kandung itu diisolasi dan dimurnikan, pertama-tama harus kita tentukan dahulu golongannya, kemudian barulah ditentukan jenis senyawa dalam golongan tersebut. Sebelum itu, kebersamaan senyawa tersebut harus diperiksa dengan cerman, artinya senyawa harus membentuk bercak tunggal dalam beberapa system KLT dan/atau KKt.

Identifikasi lengkap dalam golongan senyawa bergantung pada pengukuran sifat atau ciri lain, yang kemudian dibandingkan dengan data dalam pustaka. Sifat yang diukur termasuk titik leleh (untuk senyawa padat), titik didih (untuk cairan), putaran optik (untuk senyawa aktif optik), dan R_f. Tetapi, data mengenai senyawa tumbuhan yang sama ialah cirri spektrumnya, termasuk

pengukuran spektrum UV, infra merah (IM), resonansi magnet inti (RMI), dan spectrum masa (MS). Biasanya senyawa yang pernah diketahui dapat diidentifikasi berdasarkan data diatas. Untuk pemastian akhir harus dilakukan perbandingan langsung dengan senyawa autentik (bila ada). Bila senyawa autentik tidak ada, perbandingan seksama dengan data pustaka sudah cukup untuk identifikasi.

Pustaka

Harborne, J.B, 1987, Metoda Fitokimia, terjemahan Kosasih P, terbitan kedua, Penerbit ITB, Bandung.