





**PENGESAHAN**  
**MODUL PRAKTIKUM FITOKIMIA**

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh*

Puji Syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala atas nikmat yang senantiasa tercurah pada kita semua. Teriring salam dan do'a, semoga Bapak/Ibu selalu dalam lindungan Allah Subhanahu wa ta'ala dalam menjalankan tugas, Aamiin.

Dengan mengucapkan Alhamdulillah, akhirnya penyusunan modul Praktikum Fitokimia dapat selesai dengan baik sesuai dengan yang diarahkan kepada penyusun. Keberhasilan ini tidak luput dari kerja keras dan kerjasama dari semua pihak terkait. Modul praktikum Fitokimia adalah acuan yang digunakan mahasiswa praktek (praktikan) Strata 1 (S1) jurusan Farmasi untuk melakukan prosedur kerja di Laboratorium Fitokimia Kami memohon maaf jika masih terdapat kekurangan dalam penyusunan modul ini. Semoga modul yang telah dibuat ini memberikan banyak manfaat dan mudah untuk dipahami dalam proses pembelajaran oleh mahasiswa dan para pembaca lain terkait dengan ilmu pengetahuan di bidang Fitokimia khususnya isolasi dan identifikasi metabolit dari tanaman obat Indonesia.

*Wassalammu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh*

Jakarta, November 2019

Penyusun

## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>iv</b>
<b>TATA TERTIB PRAKTIKUM</b>	<b>ix</b>
<b>DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM</b>	<b>xii</b>
<b>PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM</b>	<b>xiii</b>
<b>PRAKTIKUM 1: PENANGANAN SIMPLISIA</b>	<b>1</b>
1. KOMPETENSI DASAR	1
2. INDIKATOR CAPAIAN	1
3. TUJUAN PRAKTIKUM	1
4. URAIAN TEORI	1
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	4
6. EVALUASI	5
7. SOAL LATIHAN	7
8. DAFTAR PUSTAKA	7
<b>PRAKTIKUM 2: PENAPISAN FITOKIMIA DENGAN REAKSI WARNA</b>	<b>75</b>
1. KOMPETENSI DASAR	8
2. INDIKATOR CAPAIAN	8
3. TUJUAN PRAKTIKUM	8
4. URAIAN TEORI	9
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	13
6. EVALUASI	16
7. SOAL LATIHAN	20
8. DAFTAR PUSTAKA	20
<b>PRAKTIKUM 3: EKSTRAKSI KONVENSIONAL: MASERASI, PERKOLASI, REFLUKS, SOXHLET, INFUSA DAN DEKOK</b>	<b>21</b>
1. KOMPETENSI DASAR	21
2. INDIKATOR CAPAIAN	21
3. TUJUAN PRAKTIKUM	21

<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>21</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>24</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>27</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>28</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>28</b>

**PRAKTIKUM 4: EKSTRAKSI MODERN: ULTRASONIK DAN MICROWAVE** **29**

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>29</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>29</b>
<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>29</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>29</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>31</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>31</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>33</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>33</b>

**PRAKTIKUM 5: EKSTRAKSI MINYAK ATSIRI DENGAN METODE ENFLEURASI** **34**

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>34</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>34</b>
<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>34</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>34</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>36</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>37</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>38</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>38</b>

**PRAKTIKUM 6: EVAPORASI** **39**

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>39</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>39</b>
<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>39</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>39</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>41</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>42</b>

7. SOAL LATIHAN	43
8. DAFTAR PUSTAKA	43
<b><u>MATERI PRAKTIKUM 7: FRAKSINASI</u></b>	<b>44</b>
1. KOMPETENSI DASAR	44
2. INDIKATOR CAPAIAN	44
3. TUJUAN PRAKTIKUM	44
4. URAIAN TEORI	45
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	47
6. EVALUASI	48
7. SOAL LATIHAN	50
8. DAFTAR PUSTAKA	50
<b><u>MATERI PRAKTIKUM 8: KROMATOGRAFI KOLOM</u></b>	<b>51</b>
1. KOMPETENSI DASAR	51
2. INDIKATOR CAPAIAN	51
3. TUJUAN PRAKTIKUM	51
4. URAIAN TEORI	51
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	53
6. EVALUASI	54
7. SOAL LATIHAN	56
8. DAFTAR PUSTAKA	57
<b><u>MATERI PRAKTIKUM 9: KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)</u></b>	<b>58</b>
1. KOMPETENSI DASAR	58
2. INDIKATOR CAPAIAN	58
3. TUJUAN PRAKTIKUM	58
4. URAIAN TEORI	58
5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM	61
6. EVALUASI	65
7. SOAL LATIHAN	67
8. DAFTAR PUSTAKA	68
<b><u>MATERI PRAKTIKUM 10: ISOLASI PIPERIN</u></b>	<b>69</b>

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>69</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>69</b>
<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>69</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>70</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>71</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>72</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>73</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>74</b>

**MATERI PRAKTIKUM 11: PENETAPAN KADAR ALKALOID PIPERIN  
DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI** **75**

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>75</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>75</b>
<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>75</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>75</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>76</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>79</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>82</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>82</b>

**MATERI PRAKTIKUM 12: PENETAPAN KADAR FENOL TOTAL DENGAN  
METODE SPEKTROFOTOMETRI** **83**

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>83</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>83</b>
<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>83</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>83</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>85</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>87</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>90</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>90</b>

**MATERI PRAKTIKUM 13: PENETAPAN KADAR TANIN TOTAL DENGAN  
METODE TITRIMETRI** **91**

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>91</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>91</b>

<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>91</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>91</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>93</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>96</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>98</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>98</b>

**MATERI PRAKTIKUM 14: PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL  
DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI** **99**

<b>1. KOMPETENSI DASAR</b>	<b>99</b>
<b>2. INDIKATOR CAPAIAN</b>	<b>99</b>
<b>3. TUJUAN PRAKTIKUM</b>	<b>99</b>
<b>4. URAIAN TEORI</b>	<b>99</b>
<b>5. PELAKSANAAN PRAKTIKUM</b>	<b>100</b>
<b>6. EVALUASI</b>	<b>102</b>
<b>7. SOAL LATIHAN</b>	<b>104</b>
<b>8. DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>105</b>

## TATA TERTIB PRAKTIKUM

Mahasiswa yang diperkenankan melakukan praktikum adalah mereka yang terdaftar secara akademik, yang selanjutnya disebut sebagai **Praktikan**.

1. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai, keterlambatan lebih dari 10 menit sejak praktikum dimulai, praktikan dianggap tidak hadir.
2. Jika berhalangan hadir, praktikan harus dapat memberikan keterangan tertulis terkait dengan alasan ketidakhadirannya yang ditujukan kepada dosen praktikum.
3. Praktikan seperti no. 2 di atas, jika akan mengganti praktikum pada hari lain, wajib meminta rekomendasi tertulis terlebih dahulu dari koordinator pengampu praktikum.
4. Gunakan sepatu tertutup yang layak untuk keamanan bekerja di laboratorium. Sepatu terbuka, sandal atau sepatu hak tinggi **TIDAK BOLEH** digunakan di laboratorium.
5. Praktikan memasuki ruang laboratorium dengan telah mengenakan jas praktikum dan melepaskan jas praktikum setelah keluar dari ruang laboratorium. Kenakan jas berlabel nama dan terkancing dengan rapi.
6. Rambut yang panjang harus selalu diikat dan dimasukkan ke dalam jas lab untuk menghindari kontak dengan zat-zat berbahaya, mesin yang bergerak dan nyala api.
7. Praktikan wajib membawa: laporan, lembar kerja praktikum, masker, dan alat-alat yang dibutuhkan pada saat praktikum.
8. Sewaktu-waktu Dosen dapat mengadakan *Pre Test* atau *Post Test*, untuk materi-materi yang akan atau yang telah dikerjakan.
9. Praktikan tidak diperbolehkan makan, minum, dan/atau merokok di dalam laboratorium selama praktikum berlangsung.
10. Praktikan tidak diperbolehkan bersenda gurau yang mengakibatkan terganggunya kelancaran praktikum.

Sanksi terhadap pelanggaran tata tertib no.9 dan 10 di atas adalah <u>dikeluarkan dari laboratorium</u> atau tidak diperkenankan melanjutkan praktikum.
---

11. Praktikkan bertanggung jawab atas peralatan yang dipinjamnya, kebersihan meja masing-masing, serta lantai disekitarnya. Jika ada alat yang rusak segera melaporkan kepada dosen atau asisten yang ditunjuk. Praktikkan wajib mengganti alat gelas/alat lain yang dirusakkan/dipecahkan.
12. Setelah menggunakan *reagen*, praktikkan wajib meletakkan kembali pada tempat semula.
13. Pilihlah tempat yang tepat untuk melakukan percobaan. Percobaan yang melibatkan zat-zat berbahaya dan beracun harus dilakukan di dalam lemari asam.
14. **JANGAN MEMBUANG** zat-zat kimia ke wasbak!
15. Jika Anda terkena zat kimia, segeralah cuci dengan sabun dan bilaslah dengan air yang banyak. **KECUALI APABILA ANDA TERKENA TUMPAHAN/CIPRATAN BROM, FENOL ATAU ASAM SULFAT PEKAT (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> PEKAT), HINDARI MEMBILAS DENGAN AIR!!!**
16. Jika Anda terluka atau mengalami kecelakaan di laboratorium, beritahu segera dosen atau asisten praktikum. Segera hubungi pihak medis jika lukanya cukup serius.
17. Cek semua peralatan sebelum digunakan. Apabila terdapat kerusakan, segera laporkan kepada petugas laboratorium untuk segera diganti/diperbaiki.
18. **JANGAN PERNAH** melakukan pekerjaan, penyiapan sampel atau percobaan **TANPA ADANYA PENGAWASAN** supervisor laboratorium (dosen atau asisten praktikum).
19. Jika akan meninggalkan ruang laboratorium, praktikkan wajib meminta ijin kepada dosen.
20. **JANGAN** meninggalkan suatu percobaan tanpa pengawasan, terutama percobaan yang menggunakan bahan-bahan yang mudah meledak atau mudah terbakar.
21. Praktikkan melakukan analisis sesuai bagiannya masing-masing, mencatat hasilnya pada lembar kerja praktikum, serta memintakan "ACC" pada dosen

22. Lakukan selalu pengecekan terhadap hal-hal yang menunjang keselamatan kerja setiap kali selesai percobaan. **PASTIKAN** semua keran gas, keran air, saluran listrik, saluran telah dimatikan.
23. Perhiasan, *Hand Phone* dan barang berharga lain merupakan tanggung jawab masing-masing praktikan.
24. Mahasiswa tidak diperkenankan menggunakan/bermain *Hand Phone* pada saat jam praktikum sedang berlangsung.
25. **KENALI** lokasi-lokasi dan cara pengoperasian fasilitas keselamatan kerja dan keadaan darurat, seperti pemadam kebakaran, kotak P3K, alarm kebakaran, pintu darurat, dan sebagainya.
26. Selalu cuci tangan dan lengan Anda sebelum meninggalkan laboratorium.

## DESKRIPSI MATA KULIAH PRAKTIKUM

Fitokimia merupakan ilmu yang mempelajari tentang kandungan kimia dalam tumbuhan. Perkembangan fitokimia didukung dengan maraknya penelitian dan peminatan masyarakat untuk *back to nature*. Tumbuhan telah lama menjadi sumber pengobatan, meskipun banyak yang hanya didasarkan pada bukti empirisnya. Namun, seiring berkembangnya keilmuan, maka penelusuran kandungan senyawa yang terkait dengan aktivitas suatu tumbuhan obat justru menarik untuk terus dilakukan untuk membuktikan khasiat yang dimaksud. Dengan demikian, hal ini kemudian dapat memberikan nilai ekonomi yang tinggi terhadap tumbuhan tersebut sebagai bahan baku obat.

Praktikum fitokimia merupakan kegiatan yang dilakukan dimana mahasiswa dapat belajar mempraktekkan cara penyiapan bahan baku yang berasal dari bahan alam (*simplisia*), melakukan ekstraksi dengan beberapa metode baik konvensional maupun modern, melakukan teknik fraksinasi untuk tujuan pemisahan, melakukan teknik isolasi menggunakan metode kromatografi kolom sederhana dan kemudian melakukan prosedur identifikasi senyawa metabolit sekunder, serta melakukan prosedur penetapan kadar senyawa tertentu dan beberapa golongan senyawa dari tanaman yang ditentukan.

## **PETUNJUK PENGGUNAAN MODUL PRAKTIKUM**

Modul Praktikum Fitokimia ini dibuat untuk mempermudah mahasiswa memahami teknik dan prosedur penyiapan simplisia, isolasi metabolit hingga identifikasi dan penentuan kadar golongan senyawa tertentu. Modul ini memuat prosedur dengan teknik yang telah umum digunakan pada buku-buku acuan seperti Farmakope Herbal Indonesia, beberapa pustaka primer lain, penelitian yang terpublikasi di jurnal-jurnal serta ditunjang oleh percobaan yang telah dilakukan oleh tim penyusun di Laboratorium Terpadu FFS UHAMKA.

Sebelum melakukan praktikum fitokimia, sebaiknya mahasiswa telah terlebih dahulu membaca tata tertib yang umum diterapkan di laboratorium. Selanjutnya, urutan kegiatan praktikum yang akan dilakukan dalam satu semester dapat dilihat pada daftar isi. Praktikum 1 dan 2 mengulas tentang prosedur penanganan simplisia serta penapisan fitokimianya melalui skrining sederhana menggunakan pereaksi warna dan pengendap. Praktikum 3, 4 dan 5 mengulas tentang prosedur ekstraksi metabolit menggunakan metode konvensional dan modern yang umum dan sering digunakan pada penelitian bahan alam. Praktikum 7 mengulas mengenai prosedur pemisahan senyawa dengan fraksinasi. Praktikum 8 dan 9 berisi ulasan mengenai prosedur kromatografi sebagai teknik pemisahan yang mengarah pada proses isolasi metabolit tumbuhan sekaligus identifikasinya. Praktikum 10 mengulas mengenai prosedur isolasi piperin suatu senyawa alkaloid sampai dengan cara identifikasinya. Praktikum 11 sampai 14 membahas mengenai penetapan kadar golongan senyawa tertentu dari ekstrak tumbuhan.

# **PRAKTIKUM 1: PENANGANAN SIMPLISIA**

## **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder

Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham dasar-dasar fitokimia dan pengertian simplisia sebagai bahan baku obat serta tujuan dibuat simplisia.

## **2. Indikator Capaian**

M1 : Mampu melakukan penyiapan simplisia sesuai standar mutu yang telah ditetapkan (S9, P5, KU2)

## **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan cara pembuatan simplisia
- b. Memahami prinsip kerja setiap tahapan pembuatan simplisia
- c. Memahami derajat kehalusan serbuk

## **4. Uraian Teori**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain berupa

bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi 3 jenis, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang 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 dikeluarkan dari selnya atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum merupakan senyawa kimia murni (Gunawan dan Mulyani 2004; Depkes 2008).

Simplisia nabati secara umum merupakan produk hasil pertanian atau tumbuhan obat yang telah mengalami proses pasca panen dan proses preparasi sederhana menjadi bentuk produk farmasi yang siap untuk diproses selanjutnya. Proses pemanenan dan preparasi simplisia merupakan proses yang ikut menentukan mutu simplisia. Simplisia sebagai bahan produk farmasi harus memenuhi parameter mutu suatu bahan yaitu kebenaran jenis, kemurnian (bebas dari kontaminasi kimia dan biologis) serta aturan penstabilan (wadah, penyimpanan dan transportasi) (Depkes 2000). Kualitas simplisia sangat dipengaruhi oleh bahan baku dan proses pembuatannya. Bahan baku dapat diperoleh dari tanaman liar atau tanaman yang sengaja dibudidayakan (Gunawan dan Mulyani 2004).

Tahapan pembuatan simplisia nabati, meliputi:

- a. Pengumpulan bahan tanaman: pada tahap ini dilakukan pengumpulan bahan tanaman segar yang akan digunakan. Hal yang perlu diperhatikan pada proses pemanenan simplisia adalah bagian tanaman, umur/tingkat kedewasaan tanaman, lokasi tumbuh, waktu pemanenan dan cara pengumpulan.
- b. Sortasi basah: bertujuan untuk memisahkan pengotor anorganik (berasal dari luar tanaman, contoh: tanah, kerikil) dan organik (contoh: bagian tanaman lain seperti rumput atau bagian lain dari tanaman yang tidak digunakan dan bagian yang rusak karena termakan ulat atau busuk/kering) pada bahan segar.
- c. Pencucian: bertujuan untuk membersihkan bahan tanaman dari kotoran seperti tanah dan dapat mengurangi jumlah mikroba atau cemaran pestisida. Hal yang perlu diperhatikan adalah air yang digunakan dan cara pencucian. Pencucian yang baik dilakukan dengan air bersih yang mengalir.

- d. Pengubahan bentuk (perajangan): bagian tanaman tertentu yang berukuran besar dan keras perlu dilakukan perajangan dengan tujuan untuk meningkatkan luas permukaan bahan sehingga air jaringan mudah menguap selama proses pengeringan dan bahan menjadi makin mudah dan cepat kering.
- e. Pengeringan: Tujuan pengeringan adalah menurunkan kadar air pada bahan agar tidak mudah ditumbuhi mikroba selama penyimpanan, menghilangkan aktivitas enzim sehingga menjaga kandungan zat aktif yang terkandung didalamnya, dan mempermudah proses penyimpanan karena lebih ringkas dan menjadi lebih awet. Proses pengeringan simplisia dapat secara alamiah atau buatan. Pengeringan secara alamiah dilakukan di udara terbuka yaitu di bawah sinar matahari langsung (untuk bagian tanaman yang keras, contoh: akar, kulit batang); dikering anginkan (untuk bagian tanaman yang lunak, contoh: daun, bunga); atau dijemur di bawah sinar matahari tidak langsung dengan ditutupi kain hitam, tujuannya adalah untuk menghindari penguapan yang terlalu cepat dan untuk menghindari kontak langsung gelombang sinar UV yang mampu menurunkan kualitas dari minyak atsiri yang terkandung dalam bahan. Pengeringan secara buatan menggunakan alat oven dimana suhu, kelembaban, tekanan, aliran udara dapat diatur. Suhu oven maksimal adalah 60°C.
- f. Sortasi kering: proses pemilihan bagian tanaman yang akan digunakan pada simplisia yang telah kering, misal dari bahan yang terlalu gosong, bahan yang rusak karena berjamur, atau bahan yang terkontaminasi oleh serangga atau kotoran hewan selama proses pengeringan sebelumnya.
- g. Penyimpanan : simplisia yang didapat disimpan dalam tempat yang bersih, kering dan tertutup rapat.

Setelah simplisia jadi, selanjutnya dilakukan pembuatan serbuk simplisia. Proses pembuatan serbuk simplisia memiliki peran yang penting dalam proses ekstraksi nantinya. Proses pembuatan serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan kontak antara cairan penyari dengan pelarut. Pada umumnya proses ekstraksi akan menjadi lebih cepat bila permukaan serbuk simplisia yang akan

bersentuhan (berkontak) dengan cairan pelarut semakin luas dan seragam. Keseragaman serbuk dapat diperoleh melalui prosedur pengayakan menggunakan ayakan dengan nomor tertentu (Agoes 2009).

Simplisia ada yang bersifat lunak seperti daun, bunga dan ada yang bersifat keras seperti biji, kulit kayu, akar. Simplisia yang lunak mudah ditembus oleh pelarut sehingga tidak diperlukan dibuat serbuk hingga halus, sebaliknya pada simplisia yang keras perlu dibuat serbuk hingga halus. Ayakan mesh 60 biasa digunakan untuk mengayak serbuk simplisia rimpang dan batang, sedangkan ayakan mesh 40 biasa digunakan untuk serbuk simplisia daun dan bunga.

## **5. Pelaksanaan Praktikum**

### **a. Alat dan Bahan**

Bahan : bahan tanaman yang telah ditentukan, air bersih.

Alat : timbangan, baskom, pisau, talenan, oven, blender, alu dan lumpang, ayakan mesh 20, 40, 60 atau 80, kertas bersih, wadah penyimpanan serbuk, label

### **b. Prosedur Kerja**

#### **Penanganan simplisia**

- 1) Setiap kelompok mengerjakan satu jenis sampel,
- 2) Kumpulkan bahan tanaman segar yang telah ditentukan, lalu lakukan sortasi basah dan timbang berat bahan segar tersebut,
- 3) Bahan tanaman dicuci dengan air bersih mengalir, kemudian ditiriskan.
- 4) Lakukan perajangan terlebih dahulu dengan menggunakan pisau/pemotong,
- 5) Tata bahan tanaman yang telah dirajang/yang akan dikeringkan dalam suatu wadah dan lakukan proses pengeringan,
- 6) Pengeringan dengan cara diangin-anginkan, bahan diletakan pada ruangan teduh dengan sirkulasi udara baik. Pengeringan dengan sinar matahari tidak langsung dilakukan dengan menjemur bahan di bawah sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain hitam. Pengeringan dengan menggunakan oven suhu diatur pada kisaran 40-60°C. Selama proses

pengeringan bahan harus rutin diaduk agar proses pengeringan merata di semua bagian bahan.

- 7) Setelah bahan kering lakukan sortasi kering dan timbang simplisia kering yang diperoleh,
- 8) Simpan simplisia pada wadah kering tertutup rapat dan diberi label dengan keterangan nama simplisia dan tanggal pembuatan.

#### **Penetapan derajat kehalusan serbuk**

- 1) Simplisia kering diblender/ditumbuk untuk memperkecil ukuran sampel sehingga mudah untuk diayak,
- 2) Lakukan proses pengayakan dengan menggunakan ukuran ayakan yang sesuai dengan jenis sampel.
- 3) Serbuk yang didapat disimpan dalam wadah bersih, kering dan tertutup rapat. Berikan label pada wadah dengan keterangan nama simplisia dan tanggal pembuatan.

### **6. Evaluasi**

#### **a. Hasil Percobaan**

- 1) Penentuan kekeringan simplisia  
Bobot sampel basah :  
Bobot sampel setelah kering :  
Waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan bahan :
- 2) Penentuan derajat kehalusan serbuk simplisia  
Bobot sampel setelah diayak :
- 3) Organoleptis serbuk simplisia  
Bau :  
Rasa :  
Warna :  
Bentuk :

#### **b. Pembahasan**

Dari hasil percobaan lakukan analisa dan pembahasan tentang tujuan dari tiap tahapan pembuatan simplisia yang dilakukan dan hasil serbuk simplisia yang diperoleh.



**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

**7. Soal Latihan**

1. Seorang peneliti ingin melakukan ekstraksi pada rimpang *Cucurma domestica*.

a. Jelaskan langkah pembuatan simplisia bagian tersebut dari awal hingga diperoleh serbuk rimpang *Cucurma domestica*!

Jawab:

b. Jelaskan tujuan masing-masing tahapan proses pembuatan simplisia!

Jawab:

**8. Daftar Pustaka**

- Agoes, G. 2009. *Teknologi Bahan Alam (Serial Farmasi Industri-2)*, Edisi Revisi. Penerbit ITB: Bandung.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia* Edisi I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan RI: Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan RI: Jakarta.
- Gunawan, D., dan Mulyani, S. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)* Jilid 1. Penebar Swadaya: Jakarta.

## **PRAKTIKUM 2: PENAPISAN FITOKIMIA DENGAN REAKSI WARNA**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder
- Sebelum melakukan praktikum ini, mahasiswa harus paham tentang metabolit tanaman, pengelompokan dan contoh-contohnya.

### **2. Indikator Capaian**

- M1 : Mampu melakukan penyiapan simplisia sesuai standar mutu yang telah ditetapkan (S9, P5, KU2)
- M2 : Mampu melakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder dari simplisia bahan alam (P5KU2)

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Mengidentifikasi jenis metabolit sekunder dengan menggunakan pereaksi warna dan pereaksi pengendap.
- b. Menjelaskan prosedur tentang identifikasi metabolit sekunder.
- c. Membuat berbagai macam pereaksi warna dan pereaksi pengendap.

#### 4. Uraian Teori

Tanaman melakukan metabolisme menghasilkan metabolit yang terbagi menjadi metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer adalah metabolit pembangun dimana metabolit ini dibutuhkan oleh tanaman untuk pertumbuhan dan perkembangannya sendiri. Contoh dari metabolit ini antara lain: lemak, karbohidrat, asam amino, asam nukleat, polipeptida, klorofil. Metabolit sekunder merupakan metabolit selain metabolit primer yang di dalam tumbuhan fungsinya berbeda dengan metabolit primer. Umumnya, metabolit merupakan produk akhir yang digunakan oleh tanaman untuk pertahanan diri terhadap organisme lain. Contoh dari metabolit sekunder antara lain: alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, steroid, terpenoid, glikosida dan sebagainya (Hanani 2015).

Asam amino merupakan metabolit primer yang memiliki atom Nitrogen di dalam strukturnya. Asam amino tidak berwarna, larut dalam air, serta memiliki gugus karboksilat dan amina. Berdasarkan strukturnya, asam amino terbagi menjadi 3 kelompok, yaitu: asam amino yang bersifat netral karena memiliki gugus asam yang seimbang dengan gugus amina (contoh: glisin, alanin, leusin, asam amino yang bersifat asam karena memiliki gugus asam yang lebih banyak daripada gugus amina (contoh: asam glutamat, asam aspartat) dan asam amino yang bersifat basa karena memiliki gugus amina lebih banyak daripada gugus asam (contoh: lisin). Ada juga pengelompokan lain asam amino, yaitu alifatik (contoh: lisin dan ornitin) dan heterosiklis (contoh: triptofan, tirosin, dan fenilalanin). Prosedur identifikasi keberadaan asam amino dapat dilakukan dengan menggunakan larutan 0,1% ninhidrin-aseton yang akan menimbulkan warna ungu hingga biru keabu-abuan (prolin akan berwarna kuning) (Hanani 2015).

Karbohidrat adalah metabolit primer yang dikenal juga dengan istilah sakarida. Karbohidrat mempunyai struktur stereo isomer D (dekstro) atau L (levo) tergantung pada posisi atom H dan gugus OH pada atom C asimetrik yang berdekatan dengan  $\text{CH}_2\text{OH}$ . Keduanya bersifat sama yang membedakan hanya pada rotasi optiknya. Beberapa pereaksi yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan karbohidrat antara lain: larutan Fehling (A dan B), Molisch/pereaksi

Naftol (memberikan cincin warna ungu pada bidang batas cairan), Seliwanoff (larutan resorsinol dan HCl pekat yang akan memberikan warna merah muda setelah larutan dipanaskan pada sampel yang mengandung sakarida dengan gugus keton), dan lain sebagainya (Hanani 2015).

Asam lemak merupakan senyawa karboksilat alifatik dengan rantai karbon panjang (>8). Asam lemak tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik. Asam lemak secara struktur dikelompokkan menjadi asam lemak (rantai lurus dengan atom karbon berjumlah 7-25 baik dalam bentuk bebas maupun ester), lipid (ester suatu alkohol dengan asam lemak rantai panjang), fosfolipid (mengandung gugus fosfat dan gugus lain yang biasanya bersifat basa), dan glikolipid (mengandung senyawa yang berikatan dengan gula). Identifikasi asam lemak dapat dilakukan menggunakan larutan 2', 7'-diklorofluorescein 0,2% dalam etanol (menimbulkan fluoresensi berwarna hijau muda pada latar belakang ungu pada sinar UV), larutan 0,5% rodamin B atau 6G dalam etanol (terbentuk warna kuning atau ungu kebiruan dengan latar belakang merah muda), dan asam sulfat 25% (setelah dipanaskan akan terbentuk warna coklat muda) (Hanani 2015).

Fenolik merupakan metabolit sekunder yang sering terdapat pada tanaman. Istilah ini mengacu pada senyawa yang mengandung senyawa aromatis dengan satu atau dua gugus hidroksil. Fenolik dengan lebih dari dua gugus hidroksil dinamakan polifenol. Bentuk fenol bebas (aglikon) jarang terdapat pada tanaman. Kelarutan fenol bebas yaitu pada pelarut nonpolar seperti eter. Umumnya bentuk fenol yang ada pada tanaman adalah bentuk glikosidanya (bentuk yang terikat dengan gula). Bentuk ini umumnya lebih larut dalam pelarut polar seperti air maupun metanol dan etanol. Glikosida fenolik dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam (HCl 2M di atas penangas air selama 30 menit) atau dengan basa (NaOH 2M selama 4 jam pada suhu kamar dan sebelum diekstraksi diasamkan kembali terlebih dahulu). Beberapa contoh senyawa fenol antara lain: hidrokuinon, fenol sederhana (katekol, orsinol, pirogalol, dan sebagainya), asam fenolat (asam salisilat, vanilat, protokatekuat), dan fenil propanoid (asam hidroksisinamat, kumarat, kafeat, ferulat). Cara untuk mendeteksi senyawa fenol

secara sederhana yaitu dengan menambahkan larutan besi (III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) yang akan menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat. Pereaksi lain yang juga dapat digunakan yaitu Folin Ciocalteu, vanilin-HCl pekat, vanilin- $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat (Hanani 2015).

Tanin adalah metabolit sekunder yang merupakan suatu polifenol yang terdapat di dalam jaringan kayu seperti kulit batang, atau pada daun dan buah. Tanin mampu menyebabkan koloid dalam airdan membentuk endapan dengan adanya protein. Tanin terbedakan menjadi 2 jenis, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam atau enzim. Jenis tanin ini setelah terhidrolisis akan menghasilkan beberapa molekul asam fenolat seperti asam galat dan asam heksahidroksidifenat. Contoh tanin terhidrolisis adalah galotanin dan elagitanin. Tanin terkondensasi merupakan jenis tanin yang tidak dapat dihidrolisis. Tanin ini merupakan gabungan/polimer (kondensasi) dari katekin (flavon 3-ol) atau galokatekin. Contoh dari tanin terkondensasi adalah flobafen/flobatanin. Keberadaan tanin di dalam sampel dapat diidentifikasi dengan penambahan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  yang akan memberikan warna biru kehitaman (tanin terhidrolisis) atau hijau coklat (tanin terkondensasi). Selain itu, tanin dapat pula diidentifikasi dengan menggunakan larutan gelatin 1% dalam 10% NaCl dan menimbulkan endapan berwarna putih (Hanani 2015).

Flavonoid terdapat dalam banyak tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal alam jaringan tumbuhan. Flavonoid merupakan senyawa fenol sehingga memiliki sifat agak asam dan warnanya akan berubah jika ditambah dengan basa atau amonia. Flavonoid sering dijumpai bentuk glikosidanya dibanding bentuk bebas (aglikon). Bentuk glikosidanya larut dalam pelarut polar seperti air, metanol, etanol, aseton, butanol. Sedangkan bentuk bebasnya larut dalam pelarut kurang polar seperti klorofom dan eter. Flavonoid bentuk glikosida ada dua jenis, yaitu flavonoid C-glikosida dan flavonoid O-glikosida. Flavonoid dapat diidentifikasi menggunakan uji Shinoda (serbuk Mg dan beberapa tetes HCl 5 M) yang akan menghasilkan warna merah

hingga merah keunguan sebagai tanda keberadaan flavanon, flavonol, flavanonol, dan dihidroflavonol (Hanani 2015).

Alkaloid merupakan metabolit sekunder dengan sifat basa, berasal dari tumbuhan dan hewan, umumnya memiliki atom N pada sistem cincin heterosiklik (tidak semua anggota cincin memiliki atom N). Sering memiliki aktivitas biologis pada manusia dan hewan. Alkaloid umumnya berbentuk garam sehingga lebih larut dalam pelarut air ataupun etanol, sedangkan alkaloid bentuk basa bebasnya akan larut dalam pelarut organik nonpolar seperti eter, benzena, toluen dan kloroform. Identifikasi alkaloid dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi Dragendorff (larutan iodobismutat), Mayer (larutan kalium merkuri-iodida), atau iodoplatinat (larutan kalium periodat) (Hanani 2015).

Saponin adalah metabolit sekunder yang memiliki bobot molekul tinggi. Senyawa ini larut dalam air namun tidak larut dalam pelarut non polar seperti eter. Saponin bersifat racun terhadap ikan dan dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Saponin terbagi menjadi 2, yaitu saponin steroid dan saponin triterpen. Saponin steroid memiliki inti steroid (C-27) yang terikat dengan gula. Saponin ini jika terhidrolisis akan menghasilkan aglikon yang disebut sapogenin. Contoh saponin steroid antara lain: diosgenin, tigogenin, ecdisteron. Saponin triterpen memiliki struktur inti triterpen (C-30) dan memiliki gugus gula yang lebih banyak dibanding dengan saponin steroid. Saponin ini umumnya bersifat asam karena memiliki satu atau dua gugus karbonil dalam aglikon dan/atau bagian molekul gula. Jika dihidrolisis saponin ini akan menghasilkan aglikon yang disebut sebagai sapogenin. Beberapa contoh saponin triterpen adalah asiaticosid, glisirizin, panaksadiol dan panaksatriol. Identifikasi keberadaan saponin dapat dilakukan berdasarkan kemampuan saponin dalam menghemolisis sel darah. Pengujiannya dilakukan menggunakan darah sapi yang dicampur dengan larutan natrium sitrat 3,65% (b/v) dan dapar fosfat (pH=7,4). Pengujian lain dapat dilakukan menggunakan perreaksi Liebermann-Burchard (campuran asam asetat anhidrat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) yang akan menghasilkan warna hijau hingga biru (Hanani 2015).

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

Alat : Pisau (pemotong), oven, waterbath, tabung reaksi, corong, wadah tahan panas, pipet

Bahan : Simplisia, kloroform 0,05 N, asam sulfat 2 N, pereaksi mayer, metanol, logam Mg, etanol, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi Liebermann-Burchard, aquadest

### b. Prosedur Kerja

#### 1) Identifikasi Metabolit Primer

##### a) Identifikasi Asam Amino:

- i. Larutan percobaan ditambah dengan larutan 0,1 % ninhidrin-aseton (larutan dibuat segar dan dilakukan sedikit pemanasan). Umumnya asam amino memberikan warna ungu hingga biru abu-abu, kecuali prolin yang memberikan warna kuning. Pereaksi ini dapat digunakan sebagai larutan pendeteksi pada KLT. Warna akan timbul setelah didiamkan beberapa jam dalam suhu kamar atau dengan pemanasan
- ii. Larutan percobaan ditambah dengan pereaksi fearon (PCAF), pereaksi ini spesifik untuk senyawa guanidine, yaitu kanavanin dan deaminokanavanin yang merupakan asam amino non protein yang terdapat dalam biji berbagai leguminosae.

##### b) Identifikasi Karbohidrat

- i. Reaksi Molisch (sering juga disebut sebagai reaksi naftol)  
Larutan sampel ditambahkan dengan  $\alpha$ -naftol dan asam sulfat pekat akan terjadi cincin ungu (pada batas kedua cairan). Untuk karbohidrat yang tidak larut (selulosa) dapat dilakukan dengan pengocokan.
- ii. Reaksi dengan larutan Fehling  
Larutan sampel ditambahkan reagen fehling 1 dan 2 sama banyak akan terjadi endapan merah bata karena terbentuknya endapan kupro oksida. Ini untuk monosakarida dan disakarida. Untuk karbohidrat harus terlebih dahulu diasamkan untuk membentuk gula pereduksi,

tetapi sebelum penambahan fehling harus dinetralkan terlebih dahulu

**c) Identifikasi Asam Lemak**

- i. Larutan sampel ditambahkan asam sulfat 25% pengamatan dilakukan dengan pemanasan akan terbentuk warna coklat muda. Pada glikolipid terbentuk warna coklat merah, sedangkan sulfolipid terbentuk warna merah terang
- ii. Larutan sampel ditambahkan larutan 2',7'-diklorofluorosein 0,2% dalam etanol akan menimbulkan fluoresensi warna hijau muda pada latar belakang ungu pada sinar UV.

**2) Identifikasi Metabolit Sekunder**

**a) Identifikasi Fenol**

Penyiapan larutan uji: Serbuk simplisia 2 g dalam Erlenmeyer ditambahkan 10 ml HCl 2M, dipanaskan di atas tangas air selama 30 menit. Disaring, filtrat dimasukkan dalam corong pisah. Perlakuan dilakukan sebanyak 2 kali. Filtrat kemudian ditambahkan dengan 20 ml eter, dikocok biarkan keduanya memisah. Larutan eter dipisahkan, diuapkan hingga sisa sekitar 5 ml. Lakukan identifikasi pada larutan uji:

- i. Larutan uji 1 mL ditambahkan dengan pereaksi Folin Ciocalteu dipanaskan sebentar di atas tangas air akan terjadi warna biru.
- ii. Larutan uji 1 mL ditambahkan larutan vanillin-HCl pekat akan timbul warna.
- iii. Larutan uji 1 mL ditambahkan 5 ml  $\text{FeCl}_3$  maka akan terbentuk warna ungu.

**b) Identifikasi Tanin**

Serbuk simplisia 2 g diekstraksi dengan etanol 80% 30 mL, dan dipanaskan sampai mendidih. Filtrat yang diperoleh diuapkan di atas penangas air. Pada sisa penguapan ditambahkan aquadest panas dan diaduk. Setelah dingin, larutan endapkan, cairan di atasnya dipisahkan dan larutan ini digunakan sebagai larutan uji. Prosedur identifikasi dilakukan seperti berikut:

- i. Larutan uji ditambahkan larutan 10% gelatin akan timbul endapan putih
- ii. Larutan uji ditambahkan larutan NaCl-gelatin (larutan 1% gelatin dalam larutan 10% NaCl dengan perbandingan 1:1). akan timbul endapan dan dibandingkan dengan hasil yang diatas.
- iii. Larutan uji ditambah dengan FeCl<sub>3</sub> 3% akan terjadi warna hijau, biru hingga hitam.

**c) Identifikasi Flavonoid**

Pembuatan larutan uji: serbuk simplisia 2 g ditambahkan dengan metanol sebanyak 30 mL. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan hingga kental, kemudian ditambahkan air panas. Ekstrak yang diperoleh kemudian disari menggunakan pelarut nonpolar *n*-heksana dan sisanya disari dengan menggunakan etil asetat (20 ml) diulang sebanyak 3 kali. Ekstrak etil asetat digunakan sebagai larutan uji.

- i. Uji shinoda : larutan uji diuapkan hingga kering, ditambahkan 2-3 tetes etanol, kemudian ditambahkan serbuk Mg dan beberapa tetes HCl 5M. Warna merah hingga warna merah lembayung yang timbul menandakan adanya senyawa flavanon, flavonol, flavanonol dan dihidroflavonol.
- ii. Uji dilakukan seperti diatas, tetapi serbuk Mg diganti Zn. Hanya senyawa dihidroflavonol yang meni (masih kurang ditambahi alkaloid

**d) Identifikasi Alkaloid**

Penyiapan larutan uji: Serbuk simplisia 1 g dikocok dengan methanol 20 mL dan ammonia 3 mL, panaskan suhu 60°C sambil dikocok 15 menit. Saring larutan dan filtratnya dipekatkan hingga menjadi 3 mL. tambahkan HCl 1 N 5 mL. sari larutan dengan 10 mL kloroform lalu pisahkan. Lapisan kloroform sebagai larutan uji. Lakukan identifikasi pada larutan uji:

- i. Larutan uji diteteskan 3 tetes pada kaca arloji lalu ditambahkan pereaksi Dragendorff. Catat warna endapan yang timbul.

- ii. Larutan uji diteteskan 3 tetes pada kaca arloji lalu ditambahkan pereaksi Mayer. Catat warna endapan yang timbul.
- iii. Larutan uji diteteskan 3 tetes pada kaca arloji lalu ditambahkan pereaksi Bouchardat. Catat warna endapan yang timbul.

**e) Identifikasi Triterpenoid/Steroid**

Penyiapan larutan uji: Serbuk simplisia 1 g diekstraksi dengan etanol 96% 20 mL selama 15 menit, kemudian saring. Filtratnya sebagai larutan uji.

- i. Larutan uji 1 mL direaksikan dengan 0,5 mL Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrida dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat) akan menghasilkan warna hijau biru.
- ii. Larutan uji 1 mL direaksikan dengan vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> atau anisaldehyd- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> akan menghasilkan warna biru, hijau, merah dan coklat.

**f) Identifikasi Saponin**

Penyiapan larutan uji: Serbuk simplisia 1 g diekstraksi dengan etanol 70% 20 mL diatas penangas air selama 20 menit, kemudian saring. Filtratnya diuapkan kemudian residunya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Larutan ini digunakan sebagai larutan uji.

- i. Larutan uji 1 mL ditambahkan dengan 10 mL air dan akan menghasilkan buih yang stabil dengan penambahan HCl 2 N.

**6. Evaluasi**

**a. Hasil Pengamatan**

Senyawa yang diidentifikasi	Pereaksi yang digunakan	Hasil pengamatan	Kesimpulan
<b>Metabolit primer</b>			
1. Karbohidrat			

2. Asam amino			
3. Asam lemak			
<b>Metabolit sekunder</b>			
1. Alkaloid			

2. Fenolik			
4. Flavonoid			
5. Tanin			
6. Triterpenoid/ Steroid			

7. Saponin			

**b. Pembahasan**

Dari hasil yang diperoleh, bahas tentang reaksi yang terjadi antara senyawa yang diidentifikasi dengan pereaksi yang digunakan untuk mengidentifikasi serta temuan masalah pada saat praktikum penapisan metabolit.

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan akhir praktikum yang dipresentasikan.**

**7. Soal Latihan**

1. Apa yang dimaksud dengan metabolit primer dan metabolit sekunder?

Jawab:

2. Sebutkan masing-masing dua contoh yang termasuk dalam metabolit primer dan sekunder!

Jawab:

3. Buat skema kerja cara identifikasi untuk alkaloid, flavonoid, tanin?

Jawab:

**8. Daftar Pustaka**

Harborne J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.  
Hanani, Endang. 2015. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: EGC.

## **PRAKTIKUM 3: EKSTRAKSI KONVENSIONAL: MASERASI, PERKOLASI, REFLUKS, SOXHLET, INFUSA DAN DEKOK**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham definisi, tujuan dan jenis metode ekstraksi.

### **2. Indikator Capaian**

- M3 : Mampu melakukan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi metabolit sekunder (S6, S9, P5, KU2, KU5, KK5)

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan berbagai cara ekstraksi konvensional
- b. Memahami prinsip kerja berbagai cara ekstraksi konvensional
- c. Mengekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai

### **4. Uraian Teori**

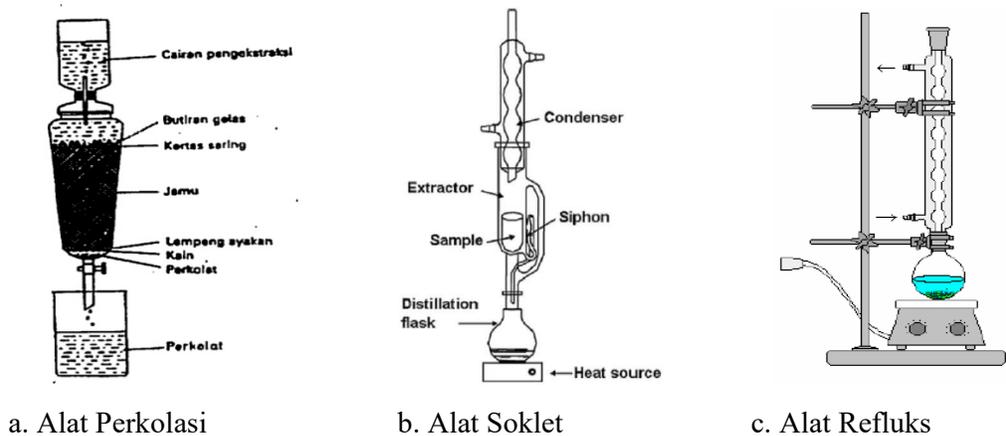
Ekstraksi atau penyarian merupakan suatu proses penarikan senyawa-senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan, hewan atau bahan alam lain menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi meliputi: pembasahan dengan pelarut, ekstraksi (penyarian) dan pemekatan. Metode ekstraksi yang

dipilih bergantung pada jenis, sifat fisik dan sifat kimia kandungan senyawa yang akan diekstraksi, pelarut yang digunakan dan alat yang tersedia di laboratorium. Pelarut yang akan digunakan disesuaikan dengan polaritas senyawa yang akan diekstraksi, dapat dimulai dari pelarut non polar (n-heksan), semi polar (etil asetat, diklorometana atau kloroform) dan polar (etanol, metanol atau bahkan air) (Hanani 2015).

Teknik yang umum untuk ekstraksi senyawa kimia secara konvensional terbagi menjadi cara dingin dan panas. Cara dingin meliputi cara maserasi dan perkolasi. Maserasi merupakan proses penyarian sederhana, yaitu dengan merendam sampel dalam pelarut yang sesuai pada suhu kamar dengan waktu tertentu dan disertai dengan pengadukan sehingga kerusakan kandungan kimia yang diekstraksi dapat diminimalisasi. Perkolasi adalah cara ekstraksi yang menggunakan pelarut yang selalu baru dengan cara mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa akan terekstraksi dengan sempurna. Keuntungan dari teknik ekstraksi dingin adalah aman untuk senyawa yang bersifat termolabil dan kelemahannya adalah membutuhkan lebih banyak jumlah pelarut dan waktu ekstraksi yang lebih lama (Hanani 2015).

Ekstraksi cara panas meliputi sokletasi, refluks, infusa dan dekok. Sokletasi adalah teknik ekstraksi secara berkesinambungan dengan alat soklet menggunakan pelarut organik pada suhu didih. Jumlah pelarut yang digunakan relatif konstan. Pada sokletasi, simplisia dan ekstrak berada pada tempat yang berbeda. Prinsipnya adalah penyarian yang dilakukan berulang-ulang sehingga penyarian lebih sempurna dan pelarut yang digunakan relatif lebih sedikit. Refluks adalah cara ekstraksi dengan alat refluks menggunakan pelarut pada suhu titik didih selama waktu tertentu dan menggunakan jumlah pelarut yang terbatas relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kelemahan cara ini adalah memungkinkan terjadinya penguraian kandungan senyawa yang termolabil (tidak tahan panas) pada sampel. Infusa adalah cara ekstraksi yang cocok untuk simplisia bersifat lunak seperti daun dan bunga dengan menggunakan pelarut air pada suhu 96 – 98°C selama 15 – 20 menit (dimulai sejak suhu mencapai 96°C). Sedangkan dekok adalah teknik ekstraksi yang

mirip dengan infus tetapi waktu yang digunakan lebih lama (30 menit) dan suhunya mencapai 100°C. Metoda perebusan (infusa dan dekok) merupakan metoda yang paling kuno dan sekarang hanya digunakan pada proses tertentu saja. Proses penyarian sering kurang sempurna dan tidak dapat digunakan untuk mengestraksi senyawa termolabil. Selain itu, hasil infusa dan dekok tidak dapat bertahan lama. Cairan infusa bertahan hanya 24 jam, sedangkan cairan dekok dapat bertahan maksimal 48 jam (Hanani 2015).



**Gambar 3.1. Alat-Alat Ekstraksi Konvensional**

Proses ekstraksi membutuhkan pelarut pengestraksi yang sesuai. Pelarut akan menembus ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan karena perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Depkes RI 1986).

Farmakope Indonesia menetapkan bahwa sebagai pelarut pengestraksi adalah air, etanol atau eter. Pemilihan pelarut pengestraksi juga harus mempertimbangkan banyak faktor (Depkes RI 1986), yaitu:

- a. Selektif
- b. Kemudahan bekerja dan proses dengan pelarut tersebut

- c. Ekonomis dan mudah diperoleh,
- d. Ramah lingkungan
- e. Aman (diperbolehkan dalam peraturan, bersifat netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar)
- f. Stabil secara fisik dan kimia dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat

Khusus untuk metanol perlu dihindari penggunaannya karena sifatnya toksik, namun sebenarnya metanol adalah pelarut yang lebih baik dibanding etanol sehingga jika menggunakan pelarut metanol maka harus dilakukan uji sisa pelarut dan nilainya harus nol (Depkes RI 1986).

Hasil dari proses ekstraksi adalah ekstrak. Ekstrak dapat berupa ekstrak cair, kental dan kering. Ekstrak kental adalah ekstrak yang sebagian besar pelarut pengekstraksinya telah berhasil diuapkan, sedangkan ekstrak kering adalah ekstrak yang tidak lagi mengandung cairan pelarut (Hanani 2015).

## **5. Pelaksanaan Praktikum**

### **a) Alat dan Bahan**

Bahan : serbuk simplisia, kertas perkamen, etanol 70%, kertas saring, kapas, benang

Alat : timbangan analitik, alat maserator, alat perkolator, alat soklet, alat refluks, panci infusa/dekok, gelas ukur, Erlenmeyer, gelas kimia, corong

### **b) Prosedur Kerja**

- 1) Setiap kelompok mengerjakan satu jenis cara ekstraksi
- 2) Siapkan alat-alat ekstraksi sesuai instruksi
  - i. Maserasi
    - (1) Wadah maserator yang telah dibersihkan dan dikeringkan ditutup dengan kertas coklat
    - (2) Timbang 100 g serbuk yang akan dimaserasi dan rendam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1 L (atau hingga pelarut setinggi  $\pm 2$  cm di atas serbuk)
    - (3) Aduk-aduk rendaman dan tutup maserator. Diamkan hingga 24 jam.

- (4) Saring rendaman dengan kain flanel dilanjut dengan menggunakan kertas saring, tampung filtrat dalam wadah, ampas kembali diremaserasi dengan pelarut.
- (5) Lakukan maserasi sekurang-kurangnya 2 kali pengulangan (atau hingga warna pelarut menjadi jernih). Tampung filtrat dan masukan ke dalam wadah tertutup rapat.

ii. Perkolasi

- (1) Rangkai alat perkolator yang sudah bersih dan kering. Sumbat leher alat dengan kapas dan lapis dasar alat dengan kertas saring.
- (2) Serbuk sebanyak 100 g dibasahi terlebih dahulu dengan sedikit pelarut etanol 70% ( $\pm$  25 mL) dalam gelas kimia diamkan 30 menit untuk memberikan waktu pelarut kontak dengan serbuk hingga serbuk mengembang.
- (3) Letakkan serbuk yang telah dibasahi secara perlahan pada alat perkolator.
- (4) Tambahkan pelarut secara perlahan ke dalam alat sampai pelarut mulai menetes dan serbuk simplisia masih terendam pelarut. Tutup perkolator dan diamkan selama 24 jam.
- (5) Setelah 24 jam, buka kran alat perkolator, biarkan cairan perkolat menetes dengan kecepatan 1 ml/menit sambil terus ditambahkan berulang-ulang pelarut pengestraksi yang baru sehingga serbuk selalu terendam pelarut.
- (6) Tampung filtrat (bila perlu saring ulang dengan kertas saring) dan masukan ke dalam wadah tertutup rapat.

iii. Sokletasi

- (1) Rangkai alat sokletasi yang sudah bersih dan kering
- (2) Serbuk sebanyak 50 gram dibungkus dengan kertas saring.
- (3) Masukkan bungkus serbuk ke bagian timbal
- (4) Masukkan pelarut hingga 1,5 siklus dan nyalakan alat soklet
- (5) Hitung lama waktu yang diperlukan untuk 1 siklus

(6) Lakukan proses sokletasi hingga warna cairan ekstrak yang menetes menjadi jernih

(7) Tampung filtrat dan masukan ke dalam wadah tertutup rapat.

iv. Refluks

(1) Rangkai alat refluks yang sudah bersih dan kering

(2) Serbuk sebanyak 100 gram diletakkan di labu alas bulat dan tambahkan pelarut hingga serbuk terendam sempurna.

(3) Nyalakan alat refluks

(4) Lakukan proses refluks selama 1-2 jam.

(5) Lakukan penyaringan filtrat menggunakan kertas saring. Tampung filtrat dan masukan ke dalam wadah tertutup rapat.

v. Infusa

(1) Siapkan panci infusa yang telah bersih dan kering.

(2) Masukan 10 g serbuk simplisia ke dalam panci dan tambahkan air secukupnya.

(3) Panaskan di tangas air selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk.

(4) Saring selagi panas dengan kain flannel.

(5) Tambahkan air hingga 100 mL. Tampung pada wadah bersih dan tertutup rapat.

vi. Dekok

(1) Siapkan panci dekok yang telah bersih dan kering.

(2) Masukan 10 g serbuk simplisia ke dalam panci dan tambahkan air secukupnya.

(3) Panaskan di tangas air selama 30 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk.

(4) Saring selagi panas dengan kain flannel.

(5) Tambahkan air hingga 100 mL. Tampung pada wadah bersih dan tertutup rapat.

## **6. Evaluasi**

### **a) Hasil Percobaan**

Volume filtrat hasil ekstraksi:

Organoleptis ekstrak

Bau :

Rasa :

Warna :

Bentuk :

### **b) Pembahasan**

Dari hasil percobaan lakukan analisa dan pembahasan tentang kelebihan dan kelemahan metode ekstraksi yang dilakukan. Lakukan analisa mengenai jenis pelarut yang digunakan terhadap senyawa kimia yang dapat terekstraksi didalamnya.

### **c) Kesimpulan**

### **d) Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

#### **7. Soal Latihan**

1. Metode ekstraksi dapat dilakukan secara dingin dan panas. Sebutkan kelebihan dan kelemahan masing-masing metode ekstraksi konvensional dan kapan metode tersebut dipilih untuk proses ekstraksi!

Jawab:

2. Jelaskan syarat pelarut yang baik untuk proses ekstraksi!

Jawab:

#### **8. Daftar Pustaka**

- Departemen Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan  
Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000, *Parameter Standart  
Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Depkes RI Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 1986. *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan RI:  
Jakarta
- Hanani, E. 2015. *Analisa Fitokimia*. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.

## **PRAKTIKUM 4: EKSTRAKSI MODERN: ULTRASONIK DAN MICROWAVE**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham definisi, tujuan dan jenis metode ekstraksi.

### **2. Indikator Capaian**

- M3 : Mampu melakukan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi metabolit sekunder (S6, S9, P5, KU2, KU5, KK5)

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan berbagai cara ekstraksi modern
- b. Memahami prinsip kerja berbagai cara ekstraksi modern
- c. Mengekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai

### **4. Uraian Teori**

Proses pemanasan pada metode konvensional tergantung pada peristiwa perpindahan panas melalui medium yang umumnya sebagian besar panas hilang ke lingkungan. Efisiensi ekstraksi dari setiap metode konvensional terutama tergantung pada pilihan pelarut. Tantangan utama ekstraksi konvensional lebih

lama waktu ekstraksi, persyaratan pelarut kemurnian tinggi dan mahal, penguapan sejumlah besar pelarut, selektivitas ekstraksi rendah dan kemungkinan besar dekomposisi oleh panas pada senyawa termolabil. Untuk mengatasi keterbatasan ini metode ekstraksi konvensional, ekstraksi baru dan menjanjikan teknik diperkenalkan. Teknik-teknik ini disebut sebagai teknik ekstraksi non-konvensional (ekstraksi modern). Ada banyak jenis metode ekstraksi modern yang berperan dalam perkembangan ilmu fitokimia, dua diantaranya yaitu *Microwave Assisted Extraction* (MAE) dan *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE).

*Microwave Assisted Extraction* (MAE) merupakan metode ekstraksi yang menggunakan gelombang mikro yaitu sekitar 2450 MHz. Metode ini selektif dan dapat digunakan untuk senyawa dengan dipol polar. Kelebihan metode MAE dibanding dengan metode ekstraksi konvensional yaitu hemat waktu dan pelarut pengestraksi. Prinsip kerja teknik ini adalah setiap bagian bahan menerima panas secara merata (tidak ada panas yang hilang ke lingkungan seperti pada metode konvensional). Proses dan hasil ekstraksi MAE dipengaruhi oleh jumlah pelarut, waktu radiasi, power/daya *microwave*, suhu dan ukuran partikel (Azmir *et al.* 2013).

*Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) adalah metode ekstraksi dengan memanfaatkan energi gelombang ultrasonik dengan frekuensi sekitar 20-2000 kHz dengan demikian permeabilitas dinding sel akan meningkat dan menyebabkan isi sel keluar (Hanani 2015). Mekanisme kerja pada teknik ekstraksi ini adalah intensifikasi massa ultrasound dengan mentransfer dan mempercepat akses pelarut ke bahan sel tanaman bagian. Mekanisme ekstraksi ultrasonik melibatkan dua jenis fenomena fisik, yaitu: (a) difusi melintasi dinding sel dan (b) melarutkan isi sel setelah memecahkan dinding selnya. Hasil ekstraksi ini tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat, rasio bahan dengan pelarutnya dan lama proses ultrasonik (waktu ekstraksi). Kelebihan metode UAE adalah proses ekstraksi lebih cepat dibandingkan dengan ekstraksi konvensional, lebih aman dan mampu meningkatkan rendemen ekstrak.

Ultrasonik juga cocok untuk diterapkan pada ekstraksi senyawa bioaktif yang termolabil (tidak tahan panas) (Azmir *et al.* 2013).

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

Alat : alat ultrasonik, seperangkat alat microwave yang dimodifikasi, gelas kimia 500 mL, labu alas bulat 500 mL.

Bahan : simplisia, etanol 70%, kertas saring,

### b. Prosedur Kerja

#### Ekstraksi dengan Ultrasonik

- 1) Sebanyak 50 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam gelas kimia.
- 2) Tambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 500 mL (1:10) b/v kedalamnya
- 3) Masukkan gelas kimia ke dalam alat ultrasonik dan lakukan ekstraksi selama 45 menit dengan frekuensi 50/60 Hz.
- 4) Hasil ekstraksi disaring dengan menggunakan kertas saring.
- 5) Tampung filtrat dan masukan ke dalam wadah tertutup rapat.

#### Ekstraksi dengan *Microwave*

- 1) Sebanyak 20 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam gelas kimia untuk di-*pre-treatment* dengan merendam dengan etanol 70% selama 10 menit.
- 2) Setelah serbuk basah, tambahkan dengan etanol 70% (1:20) b/v.
- 3) Lakukan irradiasi dengan *microwave* selama 5 menit dengan daya 630 Watt.
- 4) Filtrat disaring dari ampasnya, lalu filtrat dinginkan pada suhu ruang.
- 5) Tampung filtrat dan masukan ke dalam wadah tertutup rapat.

## 6. Evaluasi

### a. Hasil Percobaan

Volume ekstrak cair:

Organoleptis ekstrak cair

Rasa :

Bau :

Warna :

**b. Pembahasan**

Bahas tentang prinsip kerja *microwave* dan *ultrasonic* serta hasil organoleptis dari ekstrak masing-masing dari kedua metode tersebut.

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

**7. Soal Latihan**

1. Apa kelebihan dan kelemahan dari metode *microwave* untuk ekstraksi metabolit simplisia?

Jawab:

2. Apa kelebihan dan kelemahan dari metode ultrasonik untuk ekstraksi metabolit simplisia?

Jawab:

3. Jelaskan prinsip kerja ekstraksi dengan metode ultrasonik!

Jawab:

4. Jelaskan prinsip kerja ekstraksi dengan metode *microwave*!

Jawab:

**8. Daftar Pustaka**

- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., dan Omar, A.K.M. 2013. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *Journal of Food Engineering* 117: 426-436.
- Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. Buku Kedokteran EGC: Jakarta

## **PRAKTIKUM 5: EKSTRAKSI MINYAK ATSIRI DENGAN METODE ENFLEURASI**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah dibidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham definisi, tujuan dan jenis metode ekstraksi.

### **2. Indikator Capaian**

- M3 : Mampu melakukan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi metabolit sekunder (S6, S9, P5, KU2, KU5, KK5)

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan berbagai cara ekstraksi minyak atsiri dengan enfleurasi.
- b. Memahami prinsip kerja berbagai cara ekstraksi minyak atsiri dengan enfleurasi.

### **4. Uraian Teori**

Minyak atsiri merupakan senyawa yang memiliki sifat mudah menguap pada suhu kamar dengan bau yang spesifik dari tumbuhan asalnya dan rasa getir yang kadang terasa tajam dan mengigit. Minyak atsiri murni tidak menimbulkan

noda pada kertas. Minyak atsiri juga sering disebut minyak terbang (*volatile oil*) atau minyak esensial (*essential oil*). Minyak atsiri memiliki indeks bias yang umumnya tinggi, bersifat optis aktif, tidak stabil terhadap pengaruh lingkungan (misalnya udara, sinar matahari), tidak dapat disabunkan (yang membedakannya dengan minyak lemak) tidak dapat berubah menjadi berbau tengik dan larut dalam pelarut organik (Gunawan dan Mulyani 2004; Hanani 2015).

Minyak atsiri bukan merupakan senyawa tunggal namun terdiri dari berbagai macam komponen kimia mudah menguap. Komponennya sangat kompleks namun biasanya tidak lebih dari 300 senyawa. Umumnya yang menyebabkan aroma khas minyak atsiri adalah dari komponen kimia dengan persentase yang tertinggi (Agoes 2009). Komponen minyak atsiri dari kelompok terpenoid yaitu monoterpena dan sesquiterpena ( $C_{10}$  dan  $C_{15}$ ). Titik didih keduanya berbeda dimana titik didih monoterpena adalah  $140-180^{\circ}\text{C}$  sedangkan titik didih sesquiterpene  $>200^{\circ}\text{C}$  (Harborne 1987). Komponen penyusun minyak atsiri ada yang tergolong dalam kelompok hidrokarbon maupun dalam kelompok hidrokarbon teroksigenasi, seperti: aldehid, fenol, alkohol, fenol eter, oksida, keton, dan ester (Hanani 2015).

Minyak atsiri dapat diekstraksi dengan beberapa metode (Agoes 2009; Hanani 2015), yaitu:

- a. Metode destilasi merupakan metode yang paling sering digunakan. Contoh: destilasi air, destilasi uap dan destilasi uap-air. Proses destilasi dipengaruhi oleh besarnya tekanan uap, bobot molekul tiap komponen minyak atsiri, kecepatan pengeluaran minyak atsiri dari bahan tanaman. Kelemahan: tidak cocok untuk minyak atsiri yang komponennya terurai oleh panas dan air (minyak mengandung ester), larut air, dengan suhu didih tinggi tidak tersuling, atau baunya berubah dari bau alaminya.
- b. Ekstraksi dengan pelarut organik yang mudah menguap (seperti *n*-heksana, eter, benzena, toluen dan sebagainya). Metode ini cocok untuk minyak atsiri dengan kandungan kimia yang tidak tahan pemanasan dan kadar minyak atsiri dalam sampel yang rendah.

- c. Pengepresan dengan tekanan digunakan untuk minyak atsiri dengan komponen kimia yang tidak stabil, tidak tahan pemanasan, bau dan warna yang mudah berubah jika diekstraksi dengan pelarut organik, serta cocok untuk sampel dengan kadar minyak atsiri yang tinggi.
- d. Enflurasi merupakan metode yang digunakan untuk bahan lunak seperti kelopak bunga. Media pengestraksi yang digunakan adalah lemak padat seperti vaselin. Pada beberapa bunga tertentu (dalam kondisi segar), enzim pembentuk minyak atsiri masih aktif bekerja selama beberapa hari atau minggu sehingga jika bunga dihamparkan pada lapisan lemak dan didiamkan beberapa waktu maka lemak akan menyerap minyak atsiri yang dihasilkan. Pergantian bahan segar dapat dilakukan beberapa kali hingga lemak menjadi jenuh (berubah warna). Lemak dikumpulkan dan selanjutnya minyak atsiri dapat diekstraksi dengan menggunakan etanol.

## **5. Pelaksanaan Praktikum**

### **a. Alat dan Bahan**

- Alat : wadah datar dari kaca, gelas kimia, sudip, plastik wrap
- Bahan : kelopak bunga (melati/mawar/kenanga), lemak (vaselin), etanol 96%

### **b. Prosedur Kerja**

- 1) Siapkan 100 g kelopak bunga segar.
- 2) Buat lapisan tipis dari 500 g lemak vaselin pada wadah datar dari kaca. Buat goresan membentuk alur berupa garis.
- 3) Taburan kelopak bunga di atas lemak tersebut. Biarkan 24-48 jam.
- 4) Ulangi dengan kelopak bunga segar yang baru pada lapisan lemak sebelumnya. Lakukan hingga 4 minggu dan lemak berubah warna (jenuh).
- 5) Lemak dikumpulkan dengan bantuan sudip.
- 6) Ekstraksi minyak atsiri dengan 1 L etanol 96%. Dinginkan hingga suhu 15°C. Pisahkan lapisan lemak (yang membeku) dan lapisan etanol 96% dengan penyaringan.
- 7) Lakukan penyulingan minyak atsiri dari lapisan etanol 96%-nya.
- 8) Hitung volume minyak atsiri yang diperoleh.

## **6. Evaluasi**

### **a. Hasil Percobaan**

Volume minyak atsiri:

Organoleptis minyak atsiri:

Rasa :

Bau :

Warna :

Bentuk:

### **b. Pembahasan**

Dari data yang diperoleh bahas tentang komponen minyak atsiri yang dikandung pada simplisia, serta kelemahan dan kelebihan metode ekstraksi enfleurasi.

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

**7. Soal Latihan**

1. Apa yang dimaksud dengan minyak atsiri?

Jawab:

2. Jelaskan komponen utama penyusun minyak atsiri!

Jawab:

3. Jelaskan prinsip kerja metode enflurasi untuk ekstraksi minyak atsiri!

Jawab:

4. Jelaskan keuntungan dan kerugian metode enflurasi!

Jawab:

**8. Daftar Pustaka**

Agoes, G. 2009. *Teknologi Bahan Alam* (Serial Farmasi Industri-2) Edisi Revisi. Penerbit ITB: Bandung.

Gunawan, D., dan Mulyani, S. 2004. *Ilmu Obat Alam* (Farmakognosi) Jilid 1. Penebar Swadaya: Jakarta.

Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. Penerbit Kedokteran EGC. Jakarta

Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan*. Edisi II, Penerbit ITB: Bandung.

## **PRAKTIKUM 6: EVAPORASI**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham ekstrak, definisi, tujuan dan teknik-teknik evaporasi skala laboratorium.

### **2. Indikator Capaian**

- M3 : Mampu melakukan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi metabolit sekunder (S6, S9, P5, KU2, KU5, KK5).

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Melakukan cara evaporasi yang benar
- b. Memahami prinsip kerja alat evaporator
- c. Memilih metode evaporasi yang benar

### **4. Uraian Teori**

Penguapan (evaporasi) hasil ekstraksi yang masih mengandung banyak pelarut atau disebut juga proses pemekatan bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi senyawa lebih besar dan untuk memudahkan penyimpanan (Hanani 2015). Proses ini sebaiknya segera dilakukan untuk menghindari kandungan

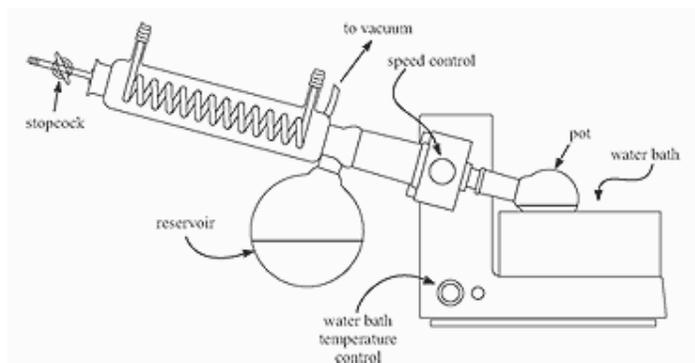
bahan alam yang mungkin tidak stabil di dalam pelarut pengekstraksinya (Heinrich dkk. 2009). Hasil akhir dari proses pemekatan adalah ekstrak yang lebih pekat (kental). Penguapan dapat bersifat parsial sehingga diperoleh ekstrak cair atau kental. Dalam proses pemekatan suhu yang digunakan sebaiknya tidak terlalu tinggi untuk mencegah peruraian senyawa dalam bentuk ekstrak (Hanani 2015). Umumnya, jika sampel yang dipekatkan bervolume besar (>5 mL) maka proses pemekatan dalam kondisi vakum dengan menggunakan evaporator, sedangkan untuk sampel bervolume kecil (<5 mL) dapat di"tiup" dengan gas nitrogen agar komponen mudah menguap tidak hilang (Heinrich dkk. 2009).

Proses penguapan dapat dilakukan dengan berbagai alat (Hanani 2015), seperti:

- a. Penangas air. Cara ini adalah cara yang sederhana, mudah digunakan dan cocok untuk pelarut yang memiliki titik didih yang tidak terlalu tinggi. Kelemahan cara ini adalah adanya kemungkinan senyawa akan terurai karena waktu yang dibutuhkan dalam proses pemekatan lebih lama.
- b. Oven. Proses pemekatan dengan menggunakan oven memiliki keuntungan suhu dapat diatur sesuai dengan titik didih pelarut. Oven lebih sering digunakan untuk penguapan yang kadar cairannya tidak terlalu banyak.
- c. Penguap berputar (*rotary evaporator*). Alat ini akan menguapkan pelarut pada suhu 40–50°C dan dibantu dengan alat vakum udara sehingga titik didih pelarut lebih rendah. Yang harus diperhatikan pada penggunaan alat ini adalah jumlah bahan yang dipekatkan dan sifat kimia dari bahan yang dipekatkan (Agoes 2009). Keuntungan penggunaan alat ini adalah waktu yang dibutuhkan lebih cepat dan kemungkinan terjadinya penguraian senyawa yang termolabil dapat dihindari.

Ekstrak kental yang diperoleh dari proses penguapan dapat dilanjutkan dengan proses pengeringan. Ekstrak kering dimaksudkan agar stabilitas senyawa lebih terjamin. Proses pengeringan ekstrak air menjadi ekstrak kering dapat dilakukan dengan menggunakan alat pengering vakum, pengering beku (*freeze dryer*) pada suhu rendah (beku) atau disebut liofilizer, dan pengering semprot (*spray dryer*) pada suhu tinggi. Pengering beku

membutuhkan waktu yang lebih lama sedangkan pengering semprot digunakan untuk senyawa yang stabil pada suhu tinggi. Cara pengeringan yang sederhana dapat menggunakan penangas air dan aliran udara panas, tetapi cara ini sulit bila digunakan untuk pelarut air (Hanani 2015). Ekstrak kering yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sebelum melakukan analisis selanjutnya (Heinrich dkk. 2009).



**Gambar 6.1. Rotary Evaporator**

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a) Alat dan Bahan

Bahan : filtrat hasil ekstraksi

Alat : timbangan analitik, *rotary evaporator*, oven, waterbath, cawan porselin, label

### b) Prosedur Kerja

- 1) Rangkai alat *rotary evaporator*.
- 2) Filtrat hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu alas bulat.
- 3) Masukkan air ke dalam *waterbath* secukupnya, atur suhu air di dalam *waterbath* pada  $40-50^{\circ}\text{C}$ .
- 4) Nyalakan evaporator dengan menekan tombol ON.
- 5) Tekan tombol pengatur untuk memutar labu.
- 6) Tunggu hingga proses berakhir dan cairan penyari telah teruapkan, usahakan tidak terlalu pekat/kental agar memudahkan ketika

mengeluarkan (menuang) hasil ekstrak kental dari labu ke dalam cawan porselin.

- 7) Lanjutkan proses pemekatan pada penangas air atau oven hingga diperoleh ekstrak dengan konsistensi kental.
- 8) Timbang ekstrak kental yang diperoleh dan hitung rendemen ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{berat simplisia yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

## 6. Evaluasi

### a) Hasil Percobaan

Organoleptik ekstrak

Rasa :

Bau :

Warna :

Bentuk:

Perhitungan persentase rendemen ekstrak:

Nilai rendemen ekstrak:

### b) Pembahasan

Dari hasil percobaan lakukan analisa dan pembahasan tentang tahapan proses pemekatan, tentang perolehan rendemen ekstrak, pentingnya menghitung nilai rendemen dan kaitannya dengan kandungan kimia yang terdapat dalam simplisia.

### **c) Kesimpulan**

### **d) Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

## **7. Soal Latihan**

1. *Rotary evaporator* adalah suatu alat untuk proses pemekatan. Apa prinsip kerja alat tersebut?

Jawab:

2. Jika 500 g serbuk diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut 750 ml etanol 70% kemudian hasil ekstrak kental hasil pemekatan adalah 125 g. Hitung berapa nilai rendemen yang didapat!

Jawab:

## **8. Daftar Pustaka**

- Agoes, G. 2009. *Teknologi Bahan Alam* (Serial Farmasi Industri-2) Edisi Revisi. Penerbit ITB: Bandung.
- Hanani, E. 2015. *Analisa Fitokimia*. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., dan Williamson, E.M. Alih Bahasa: Winny R. Syarieff, *et al.* 2009. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.

## **PRAKTIKUM 7: FRAKSINASI**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham definisi, prinsip dasar, tujuan dan teknik-teknik fraksinasi.

### **2. Indikator Capaian**

- M3 : Mampu melakukan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi metabolit sekunder (S6, S9, P5, KU2, KU5, KK5)
  - a. Ketepatan memilih pelarut yang sesuai untuk mengelompokkan senyawa, serta faktor-faktor yang mempengaruhi proses pemisahan
  - b. Ketepatan dalam mengelompokkan senyawa berdasarkan kepolaran dengan metode fraksinasi
  - c. Ketepatan melakukan penguapan hasil fraksi

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

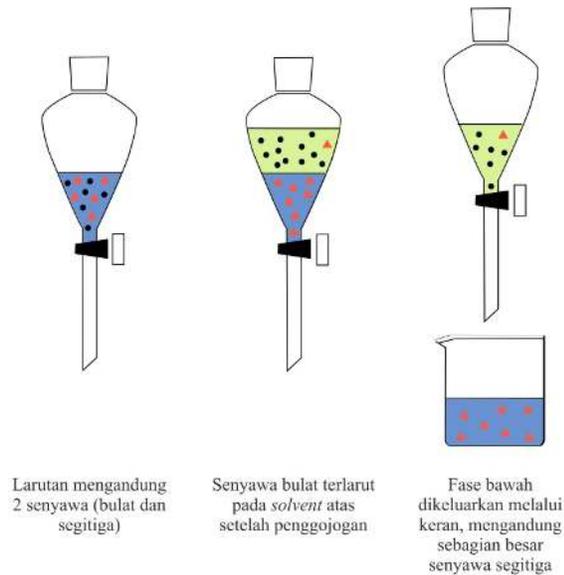
- a. Memilih pelarut yang sesuai untuk mengelompokkan senyawa
- b. Mengelompokkan senyawa berdasarkan kepolaran dengan metode fraksinasi

#### 4. Uraian Teori

Ekstrak mengandung banyak senyawa metabolit sekunder dan bahkan beberapa metabolit primer seperti karbohidrat, lipid, protein. Senyawa-senyawa tersebut memiliki sifat tertentu seperti afinitas dengan senyawa lain dan polaritas. Untuk dapat memisahkan senyawa-senyawa tersebut, diperlukan proses pemisahan berdasarkan sifat-sifat tersebut yaitu dengan melakukan proses fraksinasi. Fraksinasi pada umumnya merupakan proses pemisahan yang dapat dilakukan menggunakan zat cair dengan zat cair (ekstraksi cair-cair). Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar, dan polar berdasarkan prinsip *like dissolve likes*. Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, yang semi polar akan larut dalam pelarut semi polar, dan yang bersifat polar akan larut kedalam pelarut polar (Harborne 1987). Fraksinasi merupakan proses pemisahan komponen kimia di antara 2 fase pelarut yang tidak saling bercampur, sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua, lalu kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok, lalu didiamkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair, dan komponen kimia akan terpisah ke dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap. Hal ini berdasarkan pada **hukum distribusi atau partisi** oleh Walter Nerst yang berbunyi:

**“jika solut (zat terlarut) dilarutkan sekaligus ke dalam 2 jenis pelarut yang tidak saling bercampur, maka solut akan terdistribusi di antara kedua pelarut. Pada keadaan setimbang perbandingan konsentrasi solut berharga tetap pada suhu tetap”**

Pemisahan kedua fase tersebut didasarkan pada bobot jenis dari tiap fraksi, fraksi dengan bobot jenis tinggi akan berada paling dasar sedang fraksi dengan bobot jenis rendah akan berada diatas. Untuk melakukan proses ini dibantu menggunakan corong pisah (Gambar 7.1).



**Gambar 7.1. Proses pemisahan (fraksinasi) menggunakan corong pisah**

Corong pisah berbentuk kerucut yang ditutupi setengah bola. Ia mempunyai penyumbat di atasnya dan keran di bawahnya. Corong pisah yang digunakan dalam laboratorium terbuat dari kaca borosilikat dan kerannya terbuat dari kaca ataupun Teflon. Ukuran corong pisah bervariasi antara 50 mL sampai 3 L. Dalam skala industri, corong pemisah bisa berukuran sangat besar dan dipasang sentrifuge.

Untuk memakai corong ini, campuran dan dua fase pelarut dimasukkan ke dalam corong dari atas dengan corong keran ditutup. Pelarut yang digunakan memiliki bobot jenis yang berbeda. Corong ini kemudian ditutup dan digoyang dengan kuat untuk membuat dua fase larutan tercampur. Corong ini kemudian dibalik dan keran dibuka untuk melepaskan tekanan uap yang berlebihan. Corong ini kemudian didiamkan agar pemisahan antara dua fase berlangsung. Penyumbat dan keran corong kemudian dibuka dan dua fase larutan ini dipisahkan dengan mengontrol keran corong. Untuk memisahkan kedua lapisan yang terbentuk, dapat mengikuti prosedur berikut:

- a. Untuk mengambil lapisan bawah, buka keran corong pisah dengan perlahan hingga batas lapisan.
- b. Lapisan atas dapat diambil setelah lapisan bawah dikeluarkan semua.

- c. Lapisan atas diambil dengan menuangnya melalui mulut corong pisah hingga habis. (hati-hati agar sisa lapisan bawah yang tertinggal tidak ikut tertuang).

Beberapa hal yang harus diperhatikan saat akan memulai fraksinasi, yaitu:

- a. Sampel harus mudah didapatkan kembali dari cairan penyari
- b. Kedua solven yang akan digunakan (pelarut dan penyari) tidak saling bercampur
- c. Pelarut memiliki perbedaan bobot jenis yang nyata
- d. Pelarut memiliki titik didih yang nyata
- e. Penyari tidak mengganggu pada analisis selanjutnya
- f. Tidak menimbulkan buih dan emulsi sewaktu digojok
- g. Corong hendaknya tidak diisi melebihi  $\frac{3}{4}$  bagian
- h. Penggojokan mula-mula pelan dan kelebihan tekanan dibebaskan melalui tangkai
- i. Penggojokan dilakukan ke arah badan
- j. Jumlah ekstraksi dan volume pelarut.
- k. Penyarian lebih efektif jika proses fraksinasi dibagi dalam beberapa bagian kecil daripada sekali dengan semua penyari yang tersedia.

Kendala pada fraksinasi adalah pembentukan emulsi karena adanya fraksi lemak-lemak atau minyak yang tertarik pada pelarut nonpolar yaitu *n*-heksana atau semipolar yaitu etil asetat. Pada dasarnya emulsi dapat dipecahkan dengan metode kimia, fisika dan elektrolisis. Menggunakan metode kimia dapat digunakan dengan penambahan sejumlah tertentu asam sulfat, asam asetat atau metanol atau etanol. Sedangkan metode fisika dapat digunakan dengan memanaskan/mendinginkan corong pisah yang digunakan, penyaringan melalui glasswool maupun sentrifugasi.

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

Bahan : Ekstrak kental, akuades, etil asetat, *n*-heksana

Alat : Corong pisah, gelas ukur, gelas kimia, Erlenmeyer, botol vial

## **b. Prosedur Kerja**

- 1) Sepuluh (10) g ekstrak ditambahkan sejumlah etanol untuk melarutkan ekstrak di dalam gelas kimia, kemudian cukupkan aquadest hingga 50 ml, lalu masukkan ke corong pisah
- 2) Fraksinasi dengan pelarut nonpolar terlebih dahulu yaitu *n*-heksana sebanyak 1/3 (15 ml) di dalam corong pisah
- 3) Sebelum dikocok balikkan dulu corong pisah dan buka keran untuk mengeluarkan gas
- 4) Dikocok perlahan agar tidak terbentuk emulsi lalu buka keran corong pisah untuk mengeluarkan gas
- 5) Proses diulang 2 kali
- 6) Hasil fraksinasi dicuci lagi dengan aquadest sebanyak 1/3 (10 ml) volume fraksi *n*-heksana (idealnya), kemudian airnya dimasukkan lagi dalam fase air
- 7) Fraksinasi selanjutnya dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat dan proses selanjutnya sama seperti sebelumnya (volume etil asetat @15 ml sebanyak 2 kali)
- 8) Masing-masing fraksi monitor dengan Kromatografi Lapis Tipis
- 9) Fraksi-fraksi tersebut di simpan dalam botol vial
- 10) Masing-masing larutan fraksi diuapkan dengan *rotary evaporator* (Untuk fraksi yang akan dilanjutkan ke kolom, diambil dari yang rendemannya paling banyak, dilihat dari adanya endapan atau warna yang lebih pekat)
- 11) Simpan

## **6. Evaluasi**

### **a. Hasil Percobaan**

- 1) Mengukur volume pelarut yang digunakan
  
- 2) Mengukur volume fraksi yang dihasilkan

- 3) Perhitungan dan hasil rendemen fraksi
  
- 4) Mencatat kendala dalam proses fraksinasi

**b. Pembahasan**

Berdasarkan hasil percobaan dapat diperkirakan senyawa kimia yang terlarut dalam tiap fraksi berdasarkan literatur mengenai kandungan senyawa dalam simplisia yang diujikan dan polaritasnya

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

**7. Soal Latihan**

1. Jelaskan prinsip kerja fraksinasi!

Jawab:

2. Jelaskan syarat pelarut yang dapat digunakan untuk fraksinasi!

Jawab:

3. Sebutkan 3 contoh pelarut dengan polaritas berikut beserta senyawa metabolit sekunder yang dapat terlarut di dalamnya!

- a. Nonpolar
- b. Semipolar
- c. Polar

**8. Daftar Pustaka**

- Adjuwana, Nur M.A. 1989. *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.
- Harborne J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Houghton, P.J. dan Raman, A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. London: Chapman & Hall.

## **PRAKTIKUM 8: KROMATOGRAFI KOLOM**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2: Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5: Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5: Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder
- Sebelum melakukan praktikum, mahasiswa harus sudah paham tentang definisi, prinsip dan tujuan kromatografi dasar.

### **2. Indikator Capaian**

- M3 : Mampu melakukan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi metabolit sekunder (S6, S9, P5, KU2, KU5, KK5)

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Mengisolasi senyawa metabolit sekunder dengan teknik kromatografi kolom
- b. Mengidentifikasi senyawa hasil isolasi dengan teknik kromatografi lapis tipis

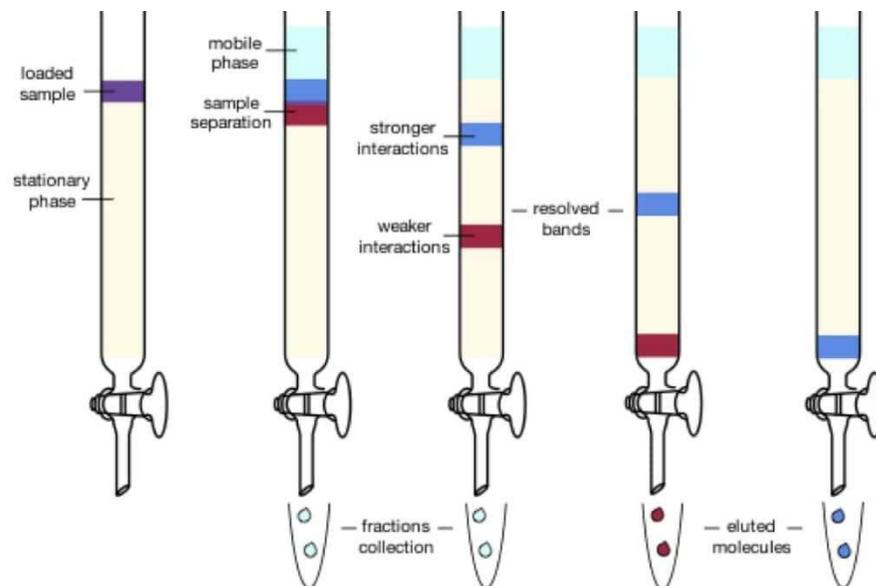
### **4. Uraian Teori**

. Kromatografi adalah teknik pemisahan berdasarkan partisi cuplikan/ sampel diantara dua fase, yaitu fase gerak, dapat berupa gas atau cair dan fase diam, dapat berupa zat cair atau zat padat (Johnon & Stevenson 1991). Senyawa-senyawa yang telah dikelompokkan pada fraksi dapat dipisahkan kembali dengan teknik kromaografi kolom.

Pada kromatografi kolom, dapat digunakan fasa diam silika gel, sedangkan pelarutnya (eluen) dapat dimulai dari pelarut nonpolar kemudian kepolarannya ditingkatkan secara bertahap (*Step Gradient Polarity/SGP*) atau selama proses

elusi menggunakan fasa gerak dengan kepolaran yang tetap (Sistem isokratik) , baik dengan pelarut tunggal atau kombinasi dua pelarut (Gritter, Bobbit & Scchwarting, 1991). Cuplikan/ sampel yang akan dipisahkan dapat disiapkan dengan dua cara:

- Sampel dilarutkan dengan cairan pengelusi dan dipipetkan langsung ke atas fasa diam/ adsorben
- Membuat bubuk preadsorpsi yaitu dengan mencampurkan sampel dengan fasa diam dengan jumlah yang sama lalu didispersikan di atas adsorben



**Gambar 8.1. Tehnik Kromatografi Kolom**

(Sumber : <https://bitesizebio.com/29947/basics-chromatography-column/>)

Tehnik lain yang bisa digunakan untuk membantu memurnikan senyawa adalah rekristalisasi yang didasarkan pada pembentukan kisi-kisi kristal yang karakteristik untuk tiap senyawa yang berbentuk kristal dan perbedaan kelarutan antara senyawa senyawa murni dengan pengotor dalam pelarut. Pelarut yang digunakan dapat berupa pelarut tunggal atau campuran. Pada pelarut campuran, salah satu pelarutnya hendaklah mempunyai daya melarutkan zat yang maksimum dibandingkan dengan pelarut lain (Mohrig 1974).

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

Bahan : hasil fraksinasi, heksan, etil asetat, metanol, silika gel

Alat : kolom kromatografi, gelas ukur, Erlenmeyer, botol, vial, kapas

### b. Prosedur Kerja

- 1) Persiapan sampel: membuat bubuk preadsorpsi atau melarutkan langsung dengan eluen sebanyak 1 gram fraksi kental.
- 2) Penyiapan kolom
  - a) Cara Kering
    - i. Kapas diletakkan di bagian dasar kolom
    - ii. Silika disiapkan sejumlah 20 kali berat sampel lalu silika dimasukkan ke dalam kolom
    - iii. Eluen ditambahkan ke dalam silika sambil kolom diketuk-ketuk secara perlahan agar silika memadat
    - iv. Sampel yang akan diisolasi diletakkan di atas adsorben/ silika
    - v. Eluen yang telah dipilih dimasukkan perlahan melalui dinding hingga sampel terelusi
  - b) Cara Basah
    - i. Kapas diletakkan di bagian dasar kolom
    - ii. Silika disiapkan sejumlah 20 kali berat sampel lalu ditambahkan eluen yang akan digunakan, diamkan beberapa saat.
    - iii. Masukkan silika yang telah basah ke dalam kolom menggunakan corong sambil diketuk-ketuk secara perlahan untuk mencegah terbentuknya gelembung udara yang dapat memecah kolom dan keran terbuka, pelarut yang keluar ditampung
    - iv. Setelah kolom sudah terbentuk dan tidak ada gelembung udara maka sampel yang akan diisolasi dapat diletakkan di atas adsorben/ silika
    - v. Lalu dielusi dengan eluen yang telah disiapkan
- 3) Hasil kromatografi di tampung ke dalam vial,



**b. Pembahasan**

Data hasil pengelompokan senyawa dilakukan analisa pola kromotografi dan kemurniannya dengan tehnik KLT. Tuliskan kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan cara pemisahan kromatografi kolom yang digunakan serta kendala yang dialami selama menggunakan tehnik itu.

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

**7. Soal Latihan**

1. Jelaskan prinsip kerja kromatografi kolom!

Jawab:

2. Sebutkan contoh-contoh fasa diam dan fasa gerak yang bisa digunakan!

Jawab:

3. Apa yang terjadi jika menampung hasil kromatografi kolom dengan volumen yang terlalu banyak ?

Jawab:

4. Sebutkan tehnik kromatografi yang dapat digunakan dalam pemisahan senyawa!

Jawab:

## 8. Daftar Pustaka

- Gritter, R. J. M. Bobbit, A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Penerbit ITB. Bandung.
- Johnson, E.L., dan R. Stevenson. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Terjemahan dari Basic Liquid Chromatography oleh Padmawinata K. Penerbit : ITB, Bandung : 1-51, 230-255 dan 278-301.
- Mohrig, J. R. 1974. *Laboratory Experiments in Organic Chemistry*. D. Van Nostrand Co.. New York. Cincinnati. Toronto. London. Melbourne.
- The Basics of Running a Chromatography Column,  
<https://bitesizebio.com/29947/basics-chromatography-column/> diakses pada tanggal 23 November 2019, pada pukul 14.55

**PRAKTIKUM 9:**  
**KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)**

**1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah dibidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data

Sebelum melakukan praktikum, mahasiswa harus sudah paham mengenai definisi, prinsip, tujuan dari kromatografi

**2. Indikator Capaian**

- M2 : Mampu melakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder dari simplisia bahan alam (P5KU2)

**3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu:

- a. Menyiapkan simplisia sesuai dengan standar mutu yang telah ditetapkan
- b. Mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder dari simplisia bahan alam
- c. Mengidentifikasi kandungan senyawa yang terdapat dalam simplisia dengan cara KLT dengan menggunakan pereaksi semprot

**4. Uraian Teori**

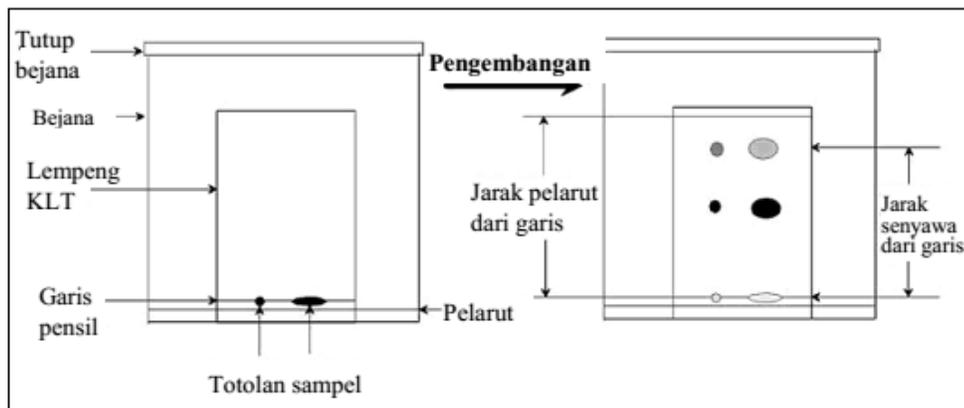
Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah bentuk dari kromatografi planar yang paling sering digunakan. KLT merupakan metode yang mudah, murah, dan cepat untuk analisis dan isolasi produk bahan alam dan sintetis (Gibbons 2012). Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu kromatografi yang paling

sederhana dari semua kromatografi lain yang sering digunakan. Hal yang dibutuhkan untuk melakukan pemisahan, analisis kualitatif, dan kuantitatif adalah bejana tertutup yang berisi pelarut dan lempeng yang dilapisi adsorben (Sherma dan Fried 2003).

Pemisahan dengan KLT dipengaruhi oleh aplikasi dari ekstrak sebagai totolan atau garis tipis pada fase diam (sorben) yang telah ditempatkan pada lempeng. Lempeng kemudian diletakkan dalam bejana dengan sejumlah pelarut yang cukup untuk membasahi bagian bawah dari lempeng tapi jangan sampai pelarut membasahi bagian dari lempeng yang ditotoli sampel. Pelarut kemudian bermigrasi pada lempeng karena aksi kapiler. Proses ini disebut dengan pengembangan (Gibbons 2012). Faktor dalam perhitungan migrasi senyawa pada fase gerak dan fase diam adalah nilai Rf. Jarak rambat senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan nilai Rf (*retardation factor*) atau hRf (*hundred retardation factor*).

$$Rf = \frac{\text{jarak rambat senyawa dari titik awal penotolan hingga pusat bercak}}{\text{jarak rambat fase gerak dari titik awal penotolan hingga garis depan}}$$

Nilai Rf yang diperoleh selalu berupa pecahan dan akan lebih mudah jika Rf dikalikan dengan 100 yang dinyatakan dengan hRf.



**Gambar 9.1. Prosedur KLT**

(Sumber: Gibbons 2012, telah diolah kembali)

Pemisahan yang terjadi pada kromatografi lapis tipis ( KLT) berdasarkan pada : adsorpsi, partisi atau kombinasi dari kedua efek (tergantung pada jenis lempeng, fase diam dan fase gerak yang digunakan). KLT dipilih untuk tujuan identifikasi karena mempunyai keuntungan yaitu :

- a. sederhana dan mudah
- b. memberikan pilihan fase gerak yang lebih beragam
- c. untuk analisa kuantitatif dan isolasi skala preparative.
- d. resolusi KLT jauh lebih tinggi daripada kromatografi kertas karena laju difusi sangat kecil pada lapisan fase gerak.
- e. zat berwarna dapat terlihat secara langsung, maupun dengan pereaksi penyemprot.
- f. jumlah sampel uji lebih sedikit (0,01-10 µg)

Fase diam yang umum dipakai adalah: silika gel ditambah kalsium sulfat yang menambah lekat pada fase diam. Selulosa, poliamide, alumina, sphadex dan *celite*. Fase gerak yang digunakan: monokomponen atau multikomponen, tetapi sebaiknya tidak lebih dari 4 macam.

Kromatogram pada KLT merupakan bercak-bercak yang terpisah setelah visualisasi dengan atau tanpa pereaksi deteksi (penyemprot) pada sinar tamapak atau sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366.

KLT dapat digunakan untuk:

- a. pemeriksaan identitas kemurnian senyawa obat
- b. pemeriksaan simplisia tanaman dan hewan
- c. pemeriksaan komposisi dan komponen aktif sediaan obat menurut label
- d. penentuan kuantitatif masing-masing senyawa aktif campuran obat

Nilai Rf tidak akan pernah lebih dari satu, dan bervariasi tergantung dari fase diam dan/atau fase gerak. Apabila fase diam yang digunakan adalah silika, maka senyawa polar akan memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap fase diam dan akan bergerak secara perlahan pada lempeng saat fase gerak bermigrasi. Senyawa-senyawa tersebut akan memiliki nilai Rf yang relatif kecil. Senyawa nonpolar memiliki afinitas yang lebih rendah terhadap fase diam silika, akan bergerak lebih cepat pada lempeng, dan akan memiliki nilai Rf yang relatif lebih

besar. Saat pengembangan, senyawa pada campuran/ekstrak akan berpisah berdasarkan polaritas relatif. Polaritas itu bergantung pada tipe dan jumlah gugus fungsi yang terdapat pada molekul yang mampu berikatan hidrogen (Gibbons 2012). 2.2.1.2 Deteksi Bahan Alam dengan KLT Pada metode KLT, visualisasi dan deteksi yang efektif merupakan hal yang krusial untuk mendapatkan senyawa murni. Deteksi bisa nondestruktif, dimana senyawa masih dapat diperoleh kembali dari fase diam (Deteksi ultraviolet) atau destruktif, dimana senyawa akan terkontaminasi dengan pereaksi pendeteksi sehingga tidak dapat diperoleh kembali dari fase diam (Deteksi semprot) (Gibbons 2012).

- a. Deteksi dengan Ultraviolet. Deteksi Ultraviolet (UV) melibatkan penggunaan senyawa aktif UV (indikator) yang digabungkan ke dalam fase diam/sorben dari lempeng KLT oleh produsen. Di bawah sinar UV gelombang pendek (254 nm), indikator akan memancarkan sinar hijau. di bawah sinar UV gelombang panjang (366 nm), indikator akan memancarkan cahaya ungu. Senyawa yang menyerap cahaya pada 254 ataupun 366 nm akan muncul sebagai noda gelap dengan latar belakang terang ketika lempengnya disinari dengan sinar UV. Kekurangan utama dari deteksi UV yaitu senyawa yang tidak menyerap sinar UV pada 254 atau 366 nm akan tidak terlihat dan membutuhkan deteksi semprot. Keuntungan utama dari deteksi UV adalah nondestruktif dan deteksi senyawa dapat langsung diamati setelah proses pemisahan (Gibbons 2012).
- b. Deteksi Semprot. Deteksi ini mengandalkan reaksi warna antara senyawa pada lempeng KLT dan pereaksi semprot yang diaplikasikan pada lempeng dengan cara disemprot. Pada beberapa kasus, panas dibutuhkan untuk membantu reaksi warna (Gibbons 2012).

## **5. Pelaksanaan Praktikum**

### **a. Alat dan Bahan**

Alat : Lempeng kromatografi (silika gel GF254), rak penyimpanan, bejana kromatografi (Chamber), Pipet mikro (micro-syringe), alat penyemprot pereaksi, lampu UV 254 dan 366 nm

Bahan : Fase gerak, pereaksi semprot, bahan uji.

## **b. Prosedur Kerja**

- 1) Larutan bahan uji (ekstrak, hasil salah satu fraksi dan hasil kromatografi kolom) dan/atau pembanding yang sudah disiapkan ditotolkan pada lempeng (jarak penotolan 1 cm) dengan volume tertentu. Dan diberikan jarak 1 cm dari tepi bawah lempeng (batas bawah), dan 0,5 cm dari tepi atas. Jarak rambat eluen adalah 5 cm. Jadi total panjang plat KLT adalah 6,5 cm. Diameter totolan dibiarkan mengering atau dapat dibantu pengeringan dengan *hairdryer*.
- 2) Penjenuhan bejana: bejana dijenuhkan dengan cara memasukkan fase gerak ke dalamnya, kemudian dibiarkan beberapa saat ( $\pm 5$  menit) atau bisa dibantu dengan memasukkan kertas saring dengan lebar 1 cm dan panjang melebihi panjang bejana/chamber, jika eluen sudah merambat sampai bagian atas kertas saring yang berada diluar bejana, maka chamber/bejana dianggap sudah jenuh.
- 3) Lempeng dimasukkan dalam bejana/chamber (yang telah jenuh dengan fase gerak), dengan posisi tegak dan bagian tepi bawah tercelup dalam fase gerak, tetapi totolan tidak terendam.
- 4) Bejana ditutup rapat dan fase gerak dibiarkan merambat hingga batas jarak rambat.
- 5) Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di udara. Perhatikan bercak yang timbul pada sinar tampak, UV254 dan UV366nm.
- 6) Diukur dan dicatat jarak rambat setiap bercak yang timbul.
- 7) Hitung nilai  $R_f$  dan/atau  $R_x$  ( $R_x$ = jarak rambat bercak dibagi jarak rambat pembanding)
- 8) Lempeng disemprot dengan pereaksi yang sesuai dan pengamatan dilakukan di (sinar tampak, UV 254 dan 366 nm). Warna yang terjadi dicatat. Kadang warna yang terjadi sesudah disemprot memerlukan suhu lebih tinggi agar pembentukan warna lebih optimum.  
Catatan: apabila dilakukan KLT dua (2) arah , sebelum dimasukkan pada fase gerak kedua, lempeng dikeringkan dulu dari fase gerak pertama.
- 9) Identifikasi senyawa dengan KLT:

- i. Senyawa fenol
  - Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : toluena:aseton:asam format (6:6:1)
  - Larutan deteksi : 5% larutan besi (III) klorida
  - Pengamatan : sinar tampak
  - Pembanding : asam galat
- ii. Senyawa flavonoid
  - Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : kloroform : metanol :air (80:18:2)
  - Larutan deteksi : 5% aluminium klorida dalam methanol atau larutan sitroborat (pengamatan dengan pemanasan)
  - Pengamatan : sinar tampak dan UV366nm
  - Pembanding : kuersetin/rutin
- iii. Senyawa Alkaloid
  - Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : kloroform : methanol (95:5)
  - Larutan deteksi : Dragendorff, pereaksi iodoplatinat, asam sulfat dalam etanol 10%
  - Pengamatan : sinar tampak dan UV366nm
  - Pembanding : piperin
- iv. Senyawa antrakuinon
  - Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : etil asetat : metanol :air (100 : 13,5 : 10)
  - Larutan deteksi : 10% KOH–etanol
  - Pengamatan : sinar tampak dan UV 254 dan 366nm
  - Pembanding : aloin, skopoletin
- v. Senyawa minyak atsiri
  - Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : benzena : kloroform (1:1) atau benzena : etil asetat (19:1)

Larutan deteksi : asam sulfat 5% dalam methanol atau larutan anisaldehyd-asam sulfat

Pengamatan : sinar tampak dan UV366

vi. Senyawa saponin

Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>

Fase gerak : kloroform : metanol :air (64:50:10) dapat digunakan untuk semua kelompok saponin

Larutan deteksi :

1. Carr-price (antimon triklorida 20% dalam kloroform), kemudian dipanaskan setelah disemprot akan menghasilkan warna ungu merah (pada sinar tampak, warna biru hijau pada UV366 nm).
2. Liebermann-burchad (campuran asam asetat anhidrad dan asam sulfat pekat) memberikan warna hijau hingga biru setelah pemanasan.
3. Vanilin-asam sulfat memberikan warna biru hingga ungu biru kadang kekuningan pada kebanyakan saponin.
4. Anisaldehyd-asam sulfat, warna mirip warna vanilin-asam sulfat.
5. Komarowsky, setelah disemprot lempeng dipanaskan sambil diamati warna yang timbul yaitu biru, kuning dan merah.
6. Pereaksi darah, warna putih (atau tidak berwarna) akan timbul pada latar belakang kemerahan. Hemolisis dapat terjadi dengan segera atau beberapa saat setelah penyemprotan.

Pembanding : karotenoid

vii. Senyawa glikosida jantung

Fase diam : lempeng silica gel 60 F<sub>254</sub>

Fase gerak : etil asetat : metanol : air (100:13,5:10) atau (81:11:8) untuk bentuk glikosida. Etil asetat:piridin:air (5:1:4)

Larutan deteksi : Pereaksi Kedde (untuk cincin  $\gamma$ -lakton), kelompok kardenolida akan timbul warna merah muda atau ungu biru pada pengamatan sinar tampak, warna akan menjadi pucat atau berkurang

setelah beberapa saat, tetapi akan timbul kembali dengan penyemprotan berulang

Pengamatan : sinar tampak dan UV366

## 6. Evaluasi

### a. Hasil Percobaan

#### 1) Penentuan nilai Rf

Nama sampel :

Fase gerak :

Fase diam :

Penampak bercak :

No	Rf	UV <sub>254</sub>	UV <sub>365</sub>	Visibel

#### 2) Identifikasi keberadaan (ada atau tidaknya) senyawa dengan bantuan pereaksi semprot dan perbandingan

No	Identifikasi senyawa	Penampak bercak	Hasil


**b. Pembahasan**

Dari data dan hasil percobaan lakukan analisa dan pembahasan tentang ada dan tidaknya senyawa yang diidentifikasi yang terdapat dalam simplisia/ekstrak.

### **c. Kesimpulan**

### **d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

#### **7. Soal Latihan**

1. Apakah yang dimaksud dengan KLT?

Jawab:

2. Apakah yang dimaksud dengan fase diam dan fase gerak dalam KLT?

Jawab:

3. Sebutkan keuntungan dan kerugian KLT!

Jawab:

4. Pereaksi semprot apa yang digunakan untuk identifikasi senyawa fenol, flavonoid, alkaloid, saponin dan minyak atsiri?

Jawab:

## 8. Daftar Pustaka

- Departemen Kesehatan RI.(2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Jakarta. Ditjen POM.
- Gibbons, S. (2005). *An Introduction to Planar Chromatography*. Natural Products Isolation, 20, 77–116.
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. New York: Marcel Dekker.
- Stahl E. (1985). *Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Penerbit ITB Bandung.
- B POM RI. (2006). *Monografi Ekstak Tumbuhan Obat Indonesia*, volume 2.
- Aziz dkk. (2011). *Standarisasi Obat bahan alam*, Graha Ilmu, Yogyakarta.
- List PH dan Schmidt PC.(1989). *Phytopharmaceutical technology*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Robinson T. (1995). *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. Edisi keenam. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Wijesekera ROB. (2000). *The Medicinal Plant Industry*. Florida: CRC Press Inc.

## **PRAKTIKUM 10: ISOLASI PIPERIN**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham apa yang dimaksud dengan piperin, tanaman sumber piperin, cara ekstraksi piperin, Teknik KLT dan identifikasi alkaloid (kualitatif) secara umum.

### **2. Indikator Capaian**

- M2 : Mampu melakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder dari simplisia bahan alam (P5KU2)

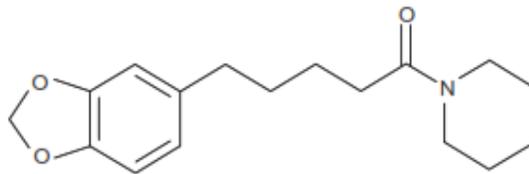
Ketepatan dalam melakukan prosedur isolasi piperin dari ekstrak tanaman tertentu dengan cara yang sederhana hingga melakukan identifikasi hasil isolatnya secara kualitatif dengan metode KLT.

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan mampu melakukan isolasi senyawa alkaloid piperin dari simplisia menggunakan metode sederhana serta mengidentifikasi hasil isolasinya menggunakan metode KLT.

#### 4. Uraian Teori

Piperin merupakan senyawa alkaloid yang diisolasi dari famili Piperaceae, seperti dari buah mentah (lada hitam) dan inti dari buah matang (lada putih) dari *Piper nigrum*, dari buah cabe jawa (*Piper longum*), biji *Cubeba censis*, *Piper fainechotti* dan *Piper chaba*. Kandungan piperin dalam lada hitam bervariasi sekitar 6-9% (Shah dan Seth 2010). Piperin memiliki rumus molekul  $C_{17}H_{19}NO_3$  atau (E,E)-1-[5-(1,3-Benzodioksol-5-il)-1-okso-2,4-pentadienil] piperidin. Piperin dikelompokkan ke dalam tipe alkaloid sejati dengan struktur inti piperidin. Piperin memiliki bentuk prisma monosiklik dari alkohol dengan titik lebur 125-126°C. Piperin awalnya tidak menimbulkan rasa namun kemudian menimbulkan rasa seperti terbakar, memiliki konstanta disosiasi pK ( $18^0$ ) yaitu 12,22. Piperin dapat larut dalam petroleum eter, kloroform, etanol, metanol, tetapi tidak dapat larut di dalam air (Kolhe *et al.* 2011). Piperin larut dalam alkohol (1g/15ml) dan eter (1g/36ml) (Kar 2009).



**Gambar 10.1. Struktur Piperin (Shah dan Seth 2010)**

Seperti alkaloid pada umumnya, piperin dapat diidentifikasi secara kualitatif dengan reaksi warna menggunakan beberapa pereaksi seperti Dragendorff (larutan iodobismutat), Mayer (larutan kalium merkuri-iodida), iodoplatinat (larutan kalium periodat) dan asam fosfomolibdat. Namun, dikarenakan umumnya kadar alkaloid di dalam simplisia tidak terlalu besar, maka untuk lebih meyakinkan keberadaan alkaloid, prosedur identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi kertas ataupun KLT. Fase diam yang umum digunakan adalah silika gel 60 F<sub>254</sub>. Fase gerak untuk identifikasi piperin dalam sampel dapat digunakan *n*-heksana:etil asetat (1:1), toluen-etil asetat (7:3), diklorometan-etil asetat (3:1) ataupun benzene:etil asetat (2:1). Pengamatan di bawah sinar UV 365 piperin akan memberikan bercak dengan pendar berwarna

biru. Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm, bercak piperin akan memberikan warna ungu. Pereaksi deteksi yang dapat digunakan untuk deteksi keberadaan piperin adalah larutan Dragendorff (bercak berwarna kuning hingga jingga kemerahan pada sinar tampak) ataupun larutan anisaldehyd-asam sulfat (bercak berwarna kuning setelah plat dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit pada sinar tampak) (Shah dan Seth 2010; Hanani 2015).

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

Bahan : Simplisia buah cabe jawa atau lada, etanol 95%, KOH-etanol 10%, *n*-heksana, etil asetat, standar piperin, pereaksi Dragendorff

Alat : Seperangkat alat maserasi, *rotary evaporator*, lemari asam, oven, Erlenmeyer, gelas ukur, plat KLT silika GF<sub>254</sub>, chamber, kertas saring, aluminium foil, vial, botol semprot, UV Box

### b. Prosedur Kerja

#### 1) Ekstraksi Serbuk Simplisia yang Mengandung Piperin

- a) Setiap kelompok menggunakan satu simplisia yang telah ditetapkan.
- b) Serbuk simplisia ditimbang 10 g, diekstraksi dengan 150 ml etanol 95% menggunakan maserasi selama 2 jam. Filtrat dipekatkan.
- c) Tambahkan 10 ml KOH-etanol 10% pada ekstrak dan larutan didekantasi (diendapkan) dan dibiarkan semalam dalam lemari pendingin. Amati kristal jarum warna kuning yang timbul.
- d) Pisahkan kristal dari larutan pada vial lain. Larutan awal jangan dibuang dan dapat didiamkan lagi untuk mengumpulkan sisa kristal.
- e) Kristal yang diperoleh direkristalisasi dengan menambahkan etil asetat.
- f) Kemudian ditambahkan *n*-heksana sampai terbentuk larutan keruh (seperti susu). Pisahkan antara *gummy* pada dasar vial dengan larutan susu. Diamkan kembali hingga terbentuk kristal lagi.
- g) Larutkan kristal dengan etil asetat.
- h) Prosedur diulangi hingga didapat zat piperin murni.

## 2) Pemeriksaan Piperin secara Kualitatif dengan metode KLT

Uji coba dengan KLT dengan kondisi berikut:

Fase diam : plat KLT GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksana:etil asetat (1:1) atau diklorometan:etil asetat (3:1)

Deteksi :

- a) Sinar UV 254 nm segera setelah elusi tampak bercak berwarna gelap dengan latarbelakang plat berfluoresensi (nilai R<sub>f</sub> piperin akan terdeteksi di sekitar 0,5)
- b) Sinar UV 366 nm segera setelah elusi tampak bercak berfluoresensi biru tua
- c) Pereaksi semprot Dragendorff (bercak berwarna kuning hingga jingga kecoklatan)
- d) Hitung nilai R<sub>f</sub> isolat dan dibandingkan dengan nilai R<sub>f</sub> pembanding piperin.

## 6. Evaluasi

### a. Hasil Percobaan

#### 1) Pengamatan Kristal Piperin

Bentuk :

Warna :

#### 2) Pengamatan Hasil Kromatogram KLT

Sinar UV 254 nm:

Sinar UV 366 nm:

Setelah disemprot Dragendorff:

**b. Pembahasan**

Dari data dan hasil percobaan lakukan analisa dan pembahasan tentang hasil KLT isolat piperin dan bandingkan dengan bakunya. Bahas pula terkait reaksi pembentukan kristal yang terjadi.

**c. Kesimpulan****d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)****7. Soal Latihan**

1. Sebutkan 2 contoh tanaman yang menghasilkan metabolit piperin!

Jawab:

2. Sebutkan pelarut yang sesuai untuk mengekstraksi senyawa piperin!

Jawab:

3. Gambarkan struktur kimia dari senyawa piperin!

Jawab:

4. Sebutkan fase gerak yang umum digunakan untuk memisahkan piperin!

Jawab:

5. Sebutkan pereaksi deteksi yang digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan piperin dalam ekstrak!

Jawab:

## 8. Daftar Pustaka

Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: EGC.

Kolhe SR., Borole P, Patel U. 2011. Extraction And Evaluation Of Piperine From *Piper nigrum* Linn. *International Journal Of Applied Biology And Pharmaceutical Technology*. 2(2): 144-149

Kar A. 2014. *Farmakognosi dan Farmakobioteknologi Terjemahan: July Manurung dkk*. EGC. Jakarta. 2 (2): 503-504.

Shah, B.N., dan Seth, A.K. 2010. *Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Elsevier: Haryana, India.

# **PRAKTIKUM 11: PENETAPAN KADAR ALKALOID PIPERIN DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI**

## **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, praktikan harus sudah paham apa yang dimaksud dengan piperin, tanaman sumber piperin, cara ekstraksi piperin, identifikasi umum piperin (kualitatif).

## **2. Indikator Capaian**

- M3 : Mampu melakukan ekstraksi, fraksinasi dan isolasi metabolit sekunder (S6, S9, P5, KU2, KU5, KK5).

## **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat melakukan pengujian kuantitatif penetapan kadar senyawa alkaloid piperin dari simplisia menggunakan metode sederhana.

## **4. Uraian Teori**

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder yang secara umum mengandung unsur nitrogen (N) pada cincin heterosiklik dan bersifat basa. Senyawa alkaloid kebanyakan berbentuk padatan dan berwarna putih, meski ada

juga yang berupa cairan seperti nikotin (Hanani 2015). Alkaloid dikelompokkan menjadi 3 tipe, yaitu:

- a. Alkaloid sejati (*true alkaloids*) merupakan alkaloid yang dibentuk dari asam amino, seperti ornitin, lisin, fenilalanin/tirosin, triptofan dan histidin. Tipe alkaloid ini memiliki atom N pada sistem cincin heterosiklik, rasanya pahit dan bersifat basa. Tipe alkaloid ini di dalam tanaman dapat ditemukan dalam bentuk bebas, garam atau oksida-N. Contoh: atropin, kokain, morfin, kuinin, piperin.
- b. Protoalkaloid merupakan tipe alkaloid yang memiliki atom N tidak pada sistem cincin heterosiklik dan berasal bukan dari asam amino heterosiklik seperti L-tirosin dan L-triptofan. Tipe ini biasanya merupakan alkaloid minor dengan struktur yang sederhana. Contoh: efedrin, meskalin.
- c. Pseudoalkaloid merupakan tipe alkaloid dengan atom N dalam kerangka karbon yang tidak berasal dari asam amino, seperti asam asetat, geraniol, asam ferulat, adenin/guanin. Contoh: turunan xantin (kafein, teobromin, teofilin), solasidin dan kapsaisin.

Alkaloid dalam tumbuhan umumnya berbentuk garam dan bersifat larut dalam pelarut polar (etanol dan air). Namun, alkaloid juga terdapat dalam bentuk basanya yang lebih larut dalam pelarut organik non polar seperti eter, benzena, toluena, dan kloroform (Hanani 2015).

Secara umum, penetapan kadar alkaloid dapat ditentukan secara gravimetri (sudah jarang digunakan), titrimetri, spektrometri, KLT-densitometri, dan KCKT. Alkaloid dengan sifat basa cukup kuat dapat ditentukan dengan titrasi asam basa, sedangkan untuk alkaloid basa lemah lebih baik ditentukan secara titrasi bebas air (Hanani 2015).

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

**Alat** : toples, gelas kimia gelas ukur 25 ml, labu ukur 10 ml, plat KLT GF<sub>245</sub>, pipa kapiler, chamber, UV *box*, spektrofotometer UV-Vis, *vacuum rotary evaporator*, tangas air

**Bahan** : simplisia cabe jawa atau lada, etanol 96%, piperin baku, *n*-heksana, etil asetat, Dragendorff, diklorometana

**b. Prosedur Kerja**

**1) Pemisahan piperin dalam ekstrak menggunakan KLT**

- a) Sampel sebanyak 50 g dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 500 mL, dimasukkan ke dalam toples kaca, dan didiamkan selama 60 menit, kemudian disaring. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dan dilanjutkan dengan tangas air.
- b) Ekstrak kental dibuat dalam konsentrasi 200 µg/ml dengan cara: melarutkan 20 mg ekstrak dengan etanol 96% dan dicukupkan sampai 10 ml.
- c) Baku piperin dibuat dalam konsentrasi 100 µg/ml dengan cara: melarutkan 10 mg piperin dengan etanol 96% dan dicukupkan sampai 10 ml.
- d) Kemudian larutan ekstrak dan baku piperin masing-masing dianalisis dengan menggunakan KLT, dengan pada fase diam silika gel GF<sub>254</sub>. Fase gerak yang digunakan adalah diklorometan dan etil asetat (3:1).
- e) Chamber yang berisi fase gerak dijenuhkan dengan cara dimasukkan kertas saring ke dalam bejana yang telah berisi fase gerak, diamkan sampai kertas saring terbasahi oleh fase gerak.
- f) Larutan ekstrak dan baku pembanding sebanyak 3 µL ditotolkan dalam satu plat KLT 10cm×10cm. Kemudian plat KLT dimasukkan dalam chamber yang telah dijenuhi dengan fase gerak.
- g) Elusi dilakukan hingga fase gerak merambat sampai tanda batas atas yang telah ditandai. Plat diangkat, dikeringkan sesaat lalu nodanya diamati di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Hitung R<sub>f</sub> bercak yang sejajar dengan baku **standar** piperin.
- h) Perhitungan nilai R<sub>f</sub> menggunakan rumus:

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh sampel (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut (cm)}}$$

## 2) Pengujian kadar piperin dengan Spektrofotometer UV-VIS

### a) Pembuatan larutan induk 100 µg/ml

Baku piperin ditimbang seksama sebanyak 10 mg, dilarutkan dengan etanol p.a hingga 10 ml, kocok hingga homogen. Pipet larutan baku induk sebanyak 1 ml, dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas, kocok hingga homogen.

### b) Penentuan panjang gelombang maksimal

Larutan baku induk piperin yang telah dibuat, diukur pada spektrofotometer uv vis. Larutan baku induk piperin diukur pada panjang gelombang 200-400 nm.

### c) Pembuatan larutan seri konsentrasi standar piperin

Pembuatan larutan seri konsentrasi standar piperin yang digunakan adalah 80; 140; 200; 260; 320 µg/ml. Caranya adalah sebagai berikut: pipet sebanyak 0,8 ml dari larutan baku induk 1000 µg/ml. Kemudian ditambahkan etanol p.a hingga 10 ml dalam labu ukur, kocok hingga homogen dan diperoleh larutan dengan konsentrasi 80 µg/ml, dan seterusnya.

### d) Pembuatan kurva baku piperin

Setiap larutan seri konsentrasi piperin yang telah dibuat dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (254 nm). Hasil absorbansi dan konsentrasi yang diperoleh diplot dalam kurva, kemudian dibuat persamaan regresi linier dengan rumus  $y=bx\pm a$ .

### e) Pengukuran kadar piperin pada sampel

Sampel bercak pada plat KLT sebelumnya dikerok, kemudian ditambahkan etanol p.a sebanyak 5 ml, dan disaring. Kemudian filtrat diukur pada panjang gelombang maksimum piperin (254 nm). Absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier  $y=bx\pm a$ , sehingga persentase kadar piperin dalam sampel dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar (\%)} = \frac{\text{bobot piperin dalam sampel (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

## 6. Evaluasi

### a. Hasil Percobaan

- 1) Pengamatan piperin dalam ekstrak secara kualitatif

Bobot ekstrak kental yang diperoleh:

Perhitungan pembuatan ekstrak:

Gambar hasil KLT piperin dalam ekstrak:

Nilai Rf:

- 2) Hasil Perolehan Panjang Gelombang Maksimal

3) Hasil absorbansi baku piperin

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi

4) Kurva kalibrasi baku piperin

5) Perhitungan Kadar Piperin pada Ekstrak

Bobot piperin dalam larutan ekstrak yang ditotol = .... mg

Konsentrasi sampel dalam larutan yang ditotol = ....  $\mu\text{g/mL}$

Bobot sampel dalam 3  $\mu\text{L}$  (volume penotolan) =

Konsentrasi piperin dalam larutan uji ekstrak:

$$y = bx \pm a$$

$$\dots = \dots x \pm \dots$$

$$x = \dots \mu\text{g/ml} = \dots \text{mg/mL}$$

Bobot piperin dalam larutan uji ekstrak: .....  $\text{mg/mL} \times 3 \text{ ml} = \dots$

mg

Bobot piperin dalam sampel:  $\frac{A}{B} \times C$

A = bobot piperin dalam larutan yang ditotol (mg)

B = bobot piperin dalam volume penotolan (mg)

C = bobot piperin dalam larutan ekstrak yang dianalisis (mg)

Kadar piperin dalam ekstrak:  $\frac{\text{bobot piperin dalam sampel (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$

#### **b. Pembahasan**

Dari data dan hasil percobaan lakukan analisa dan pembahasan tentang perolehan kadar piperin dari sampel ekstrak dan bandingkan hasilnya dengan literatur.

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

**7. Soal Latihan**

1. Jelaskan definisi alkaloid!

Jawab:

2. Sebutkan ciri-ciri tipe alkaloid sejati!

Jawab:

3. Sebutkan 3 senyawa yang tergolong dalam alkaloid sejati!

Jawab:

4. Sebutkan 2 metode yang dapat digunakan untuk menetapkan kadar piperin dalam ekstrak tumbuhan!

Jawab:

5. Sebutkan pelarut yang cocok untuk mengekstraksi piperin!

Jawab:

**8. Daftar Pustaka**

Harborne J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: EGC.

Depkes RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

**PRAKTIKUM 12:  
PENETAPAN KADAR FENOL TOTAL DENGAN METODE  
SPEKTROFOTOMETRI**

**1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder
- Sebelum melakukan praktikum, mahasiswa harus sudah paham mengenai definisi, jenis dan cara ekstraksi fenol.

**2. Indikator Capaian**

- M2 : Mampu melakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder dari simplisia bahan alam (P5KU2)

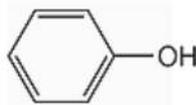
**3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat melakukan pengujian kuantitatif penetapan kadar fenol total dari ekstrak dengan menggunakan metode sederhana.

**4. Uraian Teori**

Istilah senyawa fenol digunakan untuk senyawa yang memiliki ciri adanya cincin aromatik dan satu atau dua gugus hidroksil. Oleh karena hal di atas, beberapa pustaka menggolongkan senyawa fenol ke dalam golongan senyawa aromatik. Senyawa fenol memiliki gugus hidroksil lebih dari dua disebut dengan

polifenol, sebagai contoh kelompok tanin, flavonoid, melanin, lignin (Hanani 2015)



**Gambar 12.1. Struktur Fenol (Altivia Petrochemical 2015)**

Senyawa fenol murni dapat menimbulkan rasa panas seperti terbakar jika bersentuhan dengan kulit. Hidrokuinon merupakan salah satu senyawa fenol yang penyebarannya dalam tumbuhan cukup luas. Fenol sederhana yang lain seperti orsinol, katekol, pirogalol, floroglusinol keberadaannya lebih terbatas. Fenol bebas relatif jarang terdapat pada tumbuhan, umumnya senyawa fenol berikatan dengan gula membentuk glikosida yang lebih mudah larut dalam air. Senyawa fenol dengan protein membentuk kompleks (melalui ikatan yang dapat mengakibatkan kerja enzim terhambat). Sering kali proses ekstraksi tidak berhasil dilakukan untuk memperoleh senyawa fenol karena kepekaannya terhadap enzim oksidase, seperti fenolase. Oleh pengaruh cahaya dan udara warna senyawa fenol secara perlahan menjadi gelap. Fungsi senyawa fenol terhadap tumbuhan yang sudah diketahui adalah sebagai pembangun dinding sel, pigmen bunga dan enzim. (Hanani 2015).

Mekanisme kerja dari penetapan kadar fenolik total menggunakan reagen Folin-Ciocalteu adalah terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang maksimum. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molibdenum-tungsten.

Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molibdenum-tungsten sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Untuk membuat kondisi basa digunakan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%.

Penetapan kadar fenol dalam simplisia umumnya ditentukan menggunakan pereaksi Folin Ciocalteu yang menghasilkan kadar fenol total. Sebagai pembanding dapat digunakan asam galat sehingga kadar fenol total dinyatakan setara dengan asam galat. Absorpsi diukur pada panjang gelombang 760 nm. (Hanani 2015).

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

Alat : Peralatan yang digunakan adalah blender, alat-alat gelas, timbangan analitik, aluminium foil, deksikator, mikropipet, spektrofotometer.

Bahan : Ekstrak, larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%, Reagen folin ciocalteu, aquadest, asam galat, etanol 96%, metanol

### b. Prosedur Kerja

#### 1) Pembuatan Larutan Uji Konsentrasi

Timbang 50 mg ekstrak etanol daun katuk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, volume dicukupkan dengan etanol : air (1:1) hingga tanda batas.

#### 2) Pembuatan Larutan $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 7,5%

Sebanyak 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ditambah 80 ml air suling, kemudian dididihkan sampai serbuk  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  larut sempurna. Setelah itu diamkan selama 24 jam, disaring dan diencerkan dengan air suling sampai volume 100 ml (Alfian dan Susanti 2012).

#### 3) Pembuatan Larutan Asam Galat

Sebanyak 10 mg asam galat dilarutkan dalam 0,1 ml etanol, kemudian diencerkan dengan air suling sampai volume 100,0 ml (Alfian dan Susanti 2012)

#### 4) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Sebanyak 300  $\mu\text{L}$  larutan asam galat konsentrasi 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ditambah 1,5 ml pereaksi Folin Ciocalteu (1:10), kemudian dikocok dan didiamkan selama 3 menit ke dalam larutan tersebut ditambah 1,2 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%, dikocok homogen dan diamkan pada suhu ruang kamar

kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 600-850 nm (Alfian dan Susanti 2012).

5) Penentuan Operating Time

Sebanyak 300  $\mu\text{L}$  larutan asam galat konsentrasi 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ditambah 1,5 ml reagen Folin Ciocalteu, kemudian dikocok dan didiamkan selama 3 menit. Kedalam larutan tersebut ditambah 1,2 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%, dikocok homogen, dan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-60 menit pada panjang gelombang maksimum (Alfian dan Susanti 2012).

6) Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat

Diambil 1,8 ml, 3 ml, 4,2 ml, 5,4 ml, 6,6 ml larutan asam galat dibuat dengan 5 konsentrasi yaitu 18, 30, 42, 54, dan 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$  menggunakan mikropipet dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian pada masing-masing konsentrasi ditambah 1,5 ml reagen Folin Ciocalteu (1:10) menggunakan mikropipet. Setelah didiamkan selama 3 menit, masing-masing larutan ditambah 1,2 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% menggunakan mikropipet dikocok homogen, dan didiamkan pada range operating time pada suhu kamar. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765,5 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dengan absorbansi.

7) Penentuan Kandungan Fenolik Total

Sebanyak 50 mg ekstrak dari masing-masing sampel dilarutkan sampai volume 25 ml di labu ukur yang berbeda dengan campuran etanol : aquadest (1:1) hingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Larutan ekstrak yang diperoleh dipipet 300  $\mu\text{L}$  dan ditambah 1,5 ml reagen Folin Ciocalteu dan dikocok. Didiamkan selama 3 menit, ditambah 1,2 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% dan didiamkan lagi pada waktu 60 menit. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 756,5 nm. Dilakukan 3 kali pengulangan (Murtijaya dan Lim 2007).

8) Kadar fenolik total dapat dihitung dengan rumus:

$$F = \frac{C \times v \times Fp}{m}$$

Keterangan :

F = Kadar Total Fenolik

C = Konsentrasi asam galat ( $\mu\text{g/ml}$ )

v = Volume total ekstrak

Fp = Faktor pengenceran

m = Berat sampel (g)

## 6. Evaluasi

### a. Hasil Percobaan

Hasil regresi linear kurva standar asam galat

No	Konsentrasi	Absorbansi	Persamaan kurva
			y=bx±a

Kurva kalibrasi asam galat:

Perhitungan kadar fenol total dalam ekstrak

**b. Pembahasan**

Pembahasan terhadap reaksi yang terjadi pada penetapan kadar fenol total dan bagaimana perhitungan kadar fenol total.

### c. Kesimpulan

### d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)

#### 7. Soal Latihan

1. Asam galat digunakan sebagai apa dalam penetapan kadar fenol total?

Jawab:

2. Perubahan warna apa yang terjadi pada penetapan kadar fenol total?

Jawab:

3. Apa yang dimaksud dengan senyawa fenol?

Jawab:

#### 8. Daftar Pustaka

- Departemen Kesehatan RI.(2000) *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Jakarta. Ditjen POM.
- Hanani E. 2016. *Analisis Fitokimia*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Hlm. 10-11, 65-67, 73.
- Stahl E. (1985). *Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Penerbit ITB Bandung.
- B POM RI. (2006). *Monografi Ekstak Tumbuhan Obat Indonesia*, volume 2.
- Aziz dkk. (2011). *Standarisasi Obat bahan alam*, Graha Ilmu, Yogyakarta.
- List PH dan Schmidt PC.(1989). *Phytopharmaceutical technology*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Robinson T. (1995). *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. Edisi keenam. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Wijesekera ROB. (2000). *The Medicinal Plant Industry*. Florida: CRC Press Inc.

## **PRAKTIKUM 13: PENETAPAN KADAR TANIN TOTAL DENGAN METODE TITRIMETRI**

### **1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum, mahasiswa harus sudah paham mengenai definisi, jenis, dan cara ekstraksi tanin.

### **2. Indikator Capaian**

- M2 : Mampu melakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder dari simplisia bahan alam (P5KU2)

### **3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat melakukan pengujian kuantitatif penetapan kadar senyawa tanin dari simplisia menggunakan metode titrimetri.

### **4. Uraian Teori**

Tanin merupakan senyawa polifenol yang terdapat pada jaringan kayu seperti kulit batang dan jaringan lain seperti daun dan buah. Tanin bersifat astringen sehingga dimanfaatkan untuk antidiare, menghentikan pendarahan dan mencegah peradangan mukosa mulut serta sebagai antidotum pada keracunan

logam berat dan alkaloid. Tanin banyak digunakan sebagai antiseptik karena memiliki gugus fenol (Hanani 2015).

Tanin berbentuk amorf yang mengakibatkan terjadi koloid dalam air, memiliki rasa sepat, membentuk endapan dengan penambahan logam berat, alkaloid dan gelatin (protein). Berat molekul tannin biasanya di atas 1000, sedangkan yang memiliki bobot molekul di bawah 1000 sering disebut dengan “pseudotanin”. Tanin dibedakan atas 2 kelompok (Hanani 2015), yaitu:

- a. Tanin terhidrolisis: dapat terhidrolisis oleh asam atau enzim menjadi beberapa molekul fenolat seperti asam galat dan asam heksahidroksidifenat. Contoh: galotanin dan elagitanin
- b. Tanin terkondensasi: tidak terhidrolisis, merupakan kondensasi (polimer) dari katekin (suatu flavon 3-ol). Flavolan merupakan tannin terkondensasi bentuk trimerik dari katekin (umumnya 2 sampai 20 suatu flavon), dengan ikatan karbon-karbon yang menghubungkan satu satuan flavon dengan satuan berikutnya melalui ikatan 4-8 atau 6-8.

Proses ekstraksi tanin dapat dilakukan dengan metanol, etanol, aseton, air atau campuran etanol-air. Identifikasi kualitatif tanin dilakukan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  dimana, tanin terhidrolisis memberikan endapan berwarna biru hitam sedangkan tanin terkondensasi memberikan warna hijau coklat. Selain itu, tanin dapat pula mengendap jika diberikan larutan 1% gelatin dalam 10% NaCl. Analisis kuantitatif harus diperhatikan adanya senyawa fenol lain yang dapat mengganggu penetapan kadar tanin. Cara spektrofotometri dapat dilakukan untuk mengukur kadar tanin selain dengan cara titrimetri.

Berikut beberapa metode penetapan kadar tanin secara sederhana (Hanani 2015):

- a. Kadar tanin dihitung sebagai katekin

Kadar tanin yang dihitung sebagai katekin, ditujukan untuk simplisia yang mengandung jenis tanin yang terkondensasi. Pereaksi yang digunakan adalah 10% vanillin dalam asam. Cara ini menggunakan metode spektrofotometri dengan serapan yang diukur pada panjang gelombang 530 nm, dengan pembandingnya adalah katekin.

b. Kadar tanin dihitung sebagai fenol total

Penetapan kadar ini dilakukan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu dan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh. Cara ini ditujukan untuk simplisia yang mengandung jenis tanin terhidrolisis dengan menggunakan metode spektrofotometri. Serapan diukur pada panjang gelombang 660 nm, dengan asam tanat atau asam galat dalam aquades sebagai pembanding.

c. Metode titrimetri

Penentuan kadar dengan metode ini disebut dengan metode permanganometri. Metode ini dapat dilakukan untuk mengukur tanin total dengan cara sederhana, yaitu dengan cara titrasi terhadap sari air tanin menggunakan larutan  $\text{KMnO}_4$  dan indikator larutan indigosulfonat, dengan perubahan warna dari biru menjadi kuning terang.

d. Metode gravimetri

Teknik ini dilakukan dengan menambahkan serbuk kulit (umumnya sapi) ke dalam ekstrak tanin. Campuran dibiarkan mengendap sempurna lalu disaring. Filtrat dikeringkan hingga bobot tetap. Kadar tanin dihitung dengan cara bobot filtrat sebelum dan sesudah diberikan serbuk kulit (dengan koreksi blanko) dibagi dengan berat simplisia yang diekstraksi.

## 5. Pelaksanaan Praktikum

### a. Alat dan Bahan

**Alat** : Erlenmeyer 100 mL dan 1000 mL, gelas ukur 100 mL, corong, tabung reaksi, gelas kimia 100 mL, labu ukur 250 mL, pipet volume 50 mL, pipet tetes, buret, statif dan klem, kertas saring, timbangan analitik, dan penangas

**Bahan** : Simplisia yang mengandung tanin, antara lain: daun jambu mete, daun jambu biji, biji pinang, kulit buah delima, gambir, kulit buah manggis, atau daun the; asam oksalat  $\text{H}_2\text{O}$ , aquades,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat,  $\text{FeCl}_3$  3%, indikator indigocarmin (garam natrium asam 5,5'-indigodisulfonat), kertas saring, kertas aluminium foil

## **b. Prosedur Kerja**

### **1) Pembuatan larutan pereaksi indikator indigocarmin (garam natrium asam 5,5'-indigodisulfonat)**

- a) 0,6 gram indigocarmin dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL dan dilarutkan dengan 50 mL aquades kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan penangas.
- b) Setelah itu, didinginkan dan ditambahkan aquades hingga 100 mL lalu disaring.

### **2) Pembuatan larutan $\text{KMnO}_4$ 0,1 N**

- a) 0,31 g  $\text{KMnO}_4$  ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL dan ditambahkan 100 mL aquades.
- b) Dididihkan menggunakan penangas selama 15 menit, kemudian disimpan selama satu malam.
- c) Setelah itu, disaring dan dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL. Selanjutnya diencerkan hingga mencapai 250 mL. Larutan  $\text{KMnO}_4$  dibakukan terlebih dahulu sebelum dipakai.

### **3) Pembuatan larutan asam oksalat 0,1 N**

- a) Ditimbang asam oksalat  $2\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 0,693 g, dilarutkan dengan aquades 75 mL, lalu aduk.
- b) Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan aquades sampai tanda batas pada labu ukur.
- c) Dihitung normalitas asam oksalat.

### **4) Pembakuan larutan $\text{KMnO}_4$ dengan asam oksalat 0,1 N**

- a) Dipipet 25 mL larutan asam oksalat 0,1 N. Dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml, ditambahkan 5 ml larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, dipanaskan sampai suhu  $80^\circ\text{C}$ .
- b) Kemudian dalam keadaan panas dititrasi dengan  $\text{KMnO}_4$  0,1 N.
- c) Titrasi dihentikan apabila sudah terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi berwarna merah muda (sudah mencapai titik akhir titrasi, TAT).

- d) Catat volume  $\text{KMnO}_4$  yang digunakan selama titrasi. Hitung normalitas larutan standar  $\text{KMnO}_4$  dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Normalitas KMnO}_4 = \frac{W \text{ (mg)}}{\text{BM}} \times 2 \times \text{FP} \times \frac{1}{V \text{ (ml)}}$$

Keterangan:

W = berat kristal asam oksalat yang ditimbang (mg)

BM = Berat molekul kristal asam oksalat

V = volume titrasi

FP = faktor pengenceran (25/100)

2 = adalah elektron valensi asam oksalat

### 5) Pengukuran blanko

- Disiapkan 775 ml aquades dalam Erlenmeyer 1000 ml.
- Ditambahkan indikator indogocarmin 25 ml
- Titration dengan  $\text{KMnO}_4$  hingga terjadi perubahan warna dari biru tua menjadi larutan berwarna kuning emas.
- Dicatat volume  $\text{KMnO}_4$  yang digunakan.

### 6) Penetapan kadar tanin dengan $\text{KMnO}_4$

- Serbuk simplisia ditimbang seksama 5 g lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia. Tambahkan 50 ml aquades, panaskan di atas penangas sampai mendidih selama 30 menit, sambil diaduk.
- Diamkan beberapa menit, diendapkan, lalu saring dengan kertas saring.
- Masukkan filtrat ke dalam labu ukur 250 ml.
- Ampas disari lagi dengan cara sebelumnya, lalu disaring dan filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur yang sama. Ulangi prosedur ini sampai larutan memberikan reaksi negatif terhadap larutan  $\text{FeCl}_3$ .
- Larutan didinginkan dan ditambahkan aquades sampai dengan tanda batas labu ukur 250 ml.
- Larutan dipipet sebanyak 25 ml, dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 1000 ml, ditambahkan 750 ml air dan 25 ml indikator indigocarmin.
- Titration dengan larutan 0,1 N  $\text{KMnO}_4$  hingga terjadi perubahan warna dari biru tua menjadi larutan berwarna kuning emas.

- h) Dicatat volume  $\text{KMnO}_4$  yang digunakan.
- i) Kadar tanin dihitung dengan kesetaraan 1 ml  $\text{KMnO}_4$  0,1 N setara dengan 0,004157 g tanin.

$$\text{Tanin (\%)} = \frac{(V - V_0) \times 0,004157 \times \text{FP}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

Keterangan:

V = volume titrasi tanin (mL)

$V_0$  = volume blanko (mL)

FP = faktor pengenceran (250/25)

## 6. Evaluasi

### a. Hasil Percobaan

- 1) Organoleptis ekstrak

Warna:

Bau:

- 2) Pembakuan larutan  $\text{KMnO}_4$  dengan asam oksalat 0,1 N

$$\text{Normalitas KMnO}_4 = \frac{\frac{W \text{ (mg)}}{\text{BM}} \times 2 \times \text{FP}}{V \text{ (ml)}}$$

- 3) Penetapan kadar tanin pada ekstrak dengan  $\text{KMnO}_4$

$$\text{Tanin (\%)} = \frac{(V - V_0) \times 0,004157 \times \text{FP}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

**b. Pembahasan**

Dari data dan hasil percobaan lakukan analisa dan pembahasan tentang kadar tanin yang diperoleh dan bandingkan hasilnya dengan literatur, bahas juga terkait prinsip kerja dan reaksi yang terjadi antara tanin dengan reagen yang digunakan untuk menetapkan kadar.

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

## 7. Soal Latihan

1. Sebutkan 3 simplisia yang diketahui banyak mengandung tanin!

Jawab:

2. Jelaskan pengertian tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi!

Jawab:

3. Sebutkan 3 metode yang digunakan untuk menetapkan kadar tanin total pada ekstrak!

Jawab:

4. Sebutkan larutan pereaksi yang digunakan pada penetapan kadar tanin menggunakan metode titrimetri!

Jawab:

## 8. Daftar Pustaka

Harborne J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: EGC.

Houghton, P.J. and Raman, A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. London: International Thomson Publishing

Depkes RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hlm. 12, 16-17, 169

Kar A. 2014. *Farmakognosi dan Farmakobioteknologi Terjemahan: July Manurung dkk*. EGC. Jakarta. 2 (2): 503-504.

**PRAKTIKUM 14:  
PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL DENGAN METODE  
SPEKTROFOTOMETRI**

**1. Kompetensi Dasar**

- S6 : Bekerja sama dan memiliki kepekaan sosial serta kepedulian terhadap masyarakat dan lingkungan
- S9 : Menunjukkan sikap bertanggung jawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri
- P5 : Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam pengembangan sediaan farmasi bahan alam yang aman, berkhasiat dan bermutu
- KU2 : Mampu menunjukkan kinerja mandiri, bermutu dan terukur
- KU5 : Mampu mengambil keputusan secara tepat dalam konteks penyelesaian masalah di bidang keahliannya, berdasarkan hasil analisis informasi dan data
- KK5 : Mampu mengisolasi serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder  
Sebelum melakukan praktikum mahasiswa harus sudah paham mengenai definisi, jenis, dan cara ekstraksi flavonoid.

**2. Indikator Capaian**

- M2 : Mampu melakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder dari simplisia bahan alam (P5KU2)

**3. Tujuan Praktikum**

Setelah mengikuti praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat melakukan pengujian kuantitatif penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak dengan menggunakan metode spektrofotometri.

**4. Uraian Teori**

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur inti C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan 3 satuan atom karbon (C), biasanya dengan ikatan atom O yang berupa ikatan oksigen heterosiklik. Senyawa ini dimasukkan dalam kelompok polifenol karena mengandung dua atau lebih gugus hidroksil. Flavonoid dikelompokkan menjadi

8, yaitu flavon, flavanon, flavonol, flavanonol, isoflavon, kalkon, auron, dan antosianidin (Hanani 2015).

Umumnya, flavonoid ditemukan terikat dengan gula sehingga membentuk suatu glikosida. Hal ini menyebabkan, senyawa ini lebih mudah larut dalam pelarut polar, seperti metanol, etanol, butanol, etil asetat. Polaritas flavonoid bertambah seiring dengan adanya gula yang terikat dalam bentuk glikosida, baik sebagai C-glikosida atau O-glikosida menyebabkannya mudah larut dalam air. Penetapan kadar flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri (Hanani 2015)

Spektroskopi serapan ultraviolet dan serapan tampak merupakan metode umum yang digunakan dalam menganalisa flavonoid. Kedudukan gusur hidroksi bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan adanya pereaksi geser dalam larutan sampel, dimana pergeseran puncak serapan dapat diamati (Markham, 1988). Flavonoid mengandung sistem aromatic terkonjugasi dan menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spectrum UV dan spectrum tampak (Harbone, 1987). Senyawa polifenol ini menunjukkan dua karakteristik pita serapan UV pada rentang panjang gelombang maksimum 240-285 dan 300-550 nm. Penggunaan spektroskopi UV-Vis dapat pula digunakan sebagai analisa kuantitatif pada flavonoid (Andersen dan Markham 2006).

Penggunaan pereaksi geser UV seperti aluminium klorida-asam klorida dan natrium asetat-asam borat diketahui dapat digunakan sebagai acuan pola substitusi flavonoid Andersen dan Markham, 2006). Dalam Farmakope Herbal Indonesia, penetapan kadar flavonoid dapat dilakukan dengan tiga metode dimana perbedaan terletak pada pereaksi yang digunakan (DepKes RI 2013)

## **5. Pelaksanaan Praktikum**

### **a. Alat dan Bahan**

Alat : Erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, labu ukur, pipet volume, kertas saring, spektrofotometer UV Vis, penangas

Bahan : Simplisia yang mengandung flavonoid, antara lain: daun jambu mete, daun sembung, kulit buah jeruk, herba meniran, daun salam.

Kuersetin baku, aquades, metanol, aluminium triklorida 10%, natrium asetat.

**b. Prosedur Kerja**

**Penetapan kadar flavonoid dengan metode Chang**

**a). Pembuatan kurva baku**

- i. Kuersetin 10 mg dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam labu ukur (sebagai larutan induk).
- ii. buatlah 5 larutan seri konsentrasi dari larutan induk dalam labu ukur 10 ml.
- iii. tambahkan masing-masing larutan seri konsentrasi tersebut dengan metanol hingga tanda batas.
- iv. masing-masing larutan tersebut dipipet sebanyak 2 ml dan ditambahkan dengan pereaksi 0,1 ml aluminium triklorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan 2,8 ml aquades.
- v. larutan dikocok dengan baik dan dibiarkan bereaksi selama 30 menit pada suhu ruang.
- vi. Ukur serapan larutan tersebut pada panjang gelombang 425 nm.

**b). Penetapan kadar flavonoid**

- i. Ekstrak ditimbang sebanyak 1 g dilarutkan dengan metanol dimasukkan dalam labu takar 10 ml.
- ii. Buat campuran : 0,1 ml aluminium triklorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan 2,8 ml air suling.
- iii. Masukkan campuran tadi ke dalam ekstrak metanol, dan biarkan bereaksi selama 30 menit pada suhu ruang.
- iv. Percobaan larutan blanko : larutan uji tanpa penambahan pereaksi aluminium klorida. Pereaksi aluminium klorida volumenya digantikan dengan aquadest.
- v. Ukur serapan larutan tersebut pada panjang gelombang 433 nm. kadar flavonoid total dinyatakan sebagai kuersetin ekivalensi (QE/gram ekstrak).
- vi. Kadar flavonoid total dapat dihitung dengan rumus :

$$F = \frac{C \times v \times Fp}{m}$$

Keterangan :

F = Kadar Total flavonoid

C = Konsentrasi kuersetin ( $\mu\text{g/ml}$ )

v = Volume total ekstrak

Fp = Faktor pengenceran

m = Berat sampel (g)

## 6. Evaluasi

### a. Hasil Percobaan

Hasil regresi linear kurva baku kuersetin

No	Konsentrasi	Absorbansi	Persamaan kurva kalibrasi
			y=bx±a

Kurva kalibrasi kuersetin:

Perhitungan kadar flavonoid total dalam ekstrak

**b. Pembahasan**

Pembahasan terhadap reaksi yang terjadi pada penetapan kadar flavonoid total dan bagaimana perhitungan kadar flavonoid total.

**c. Kesimpulan**

**d. Laporan (lihat Pedoman Laporan Hasil Praktikum)**

**7. Soal Latihan**

1. Mengapa flavonoid dikelompokkan dalam senyawa polifenol?

Jawab:

2. Gambarkan struktur inti flavonoid!

Jawab:

3. Sebutkan dan jelaskan dua jenis glikosida flavonoid!

Jawab:

4. Apakah flavonoid dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut polaritas rendah seperti, kloroform dan eter? Jika ya, maka sebutkan jenis flavonoid tersebut!

Jawab:

## 8. Daftar Pustaka

- Departemen Kesehatan RI.(2000) *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Jakarta. Ditjen POM.
- J. Harborne, *A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Phytochemical Methods. Chapman and Hall London.* 1998.
- Stahl E. (1985). *Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi.* Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Penerbit ITB Bandung.
- BPOM RI. (2006). *Monografi Ekstak Tumbuhan Obat Indonesia*, volume 2.
- Aziz dkk. (2011). *Standarisasi Obat bahan alam*, Graha Ilmu, Yogyakarta.
- List PH dan Schmidt PC.(1989). *Phytopharmaceutical technology.* Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Robinson T. (1995). *Kandungan organik tumbuhan tinggi.* Edisi keenam. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Wijesekera ROB. (2000). *The Medicinal Plant Industry.* Florida: CRC Press Inc.