

**PENUNTUN PRAKTIKUM  
FITOKIMIA**



**Disusun oleh :**

Rini Prastiwi, M. Si., Apt  
Vera Ladeska, M.Farm., Apt.  
Vivi Anggia , M.Farm., Apt.  
Ni Putu Ermi H, M.Farm.  
Ema Dewanti, M.Si.  
Landyyun Rahmawan Sjahid, M.Sc.appt.

**FAKULTAS FARMASI DAN SAINS  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA  
JAKARTA  
2019**

**PENUNTUN PRAKTIKUM  
FITOKIMIA**

Nama Mahasiswa : .....  
NIM : .....  
Kelas / Semester : .....  
Kelompok : .....  
Dosen : Rini Prastiwi, M.Si., Apt  
Vera Ladeska, M.Farm., Apt.  
Vivi Anggia , M.Farm., Apt.  
Ni Putu Ermi H, M.Farm.  
Ema Dewanti, M.Si.  
Landyyun Rahmawan Sjahid,  
M.Sc.apr.

**UNIT BIDANG ILMU BIOLOGI FARMASI**

**FAKULTAS FARMASI DAN SAINS  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA  
JAKARTA  
2019**

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah Yang Maha Esa atas limpahan rahmat dan petunjuknya sehingga Penuntun Praktikum Fitokimia dapat diselesaikan.

Dalam pendidikan yang didasari atas sistem kredit semester, pemahaman mata kuliah tertentu dapat dipahami melalui teori maupun praktek. Diktat praktikum ini disusun dengan maksud membantu mahasiswa dalam memahami materi kuliah serta untuk mencapai efisiensi dalam praktikum fitokimia. Harapan penyusun, diktat ini dapat dijadikan pegangan bagi staf pengajar maupun mahasiswa untuk mencapai tujuan pendidikan, khususnya dalam mata kuliah praktek fitokimia.

Dengan rasa hormat, ucapan terima kasih disampaikan kepada Dekan Fakultas Farmasi yang telah memberikan kesempatan bagi penyusunan diktat ini. Ucapan terimakasih juga ditujukan kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan secara langsung maupun tidak langsung. Akhir kata, saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan demi kemajuan bersama.

**Jakarta, September 2019**

**Tim Penyusun**

## **TATA TERTIB LABORATORIUM FITOKIMIA FFS UHAMKA**

### **TATA TERTIB UMUM**

1. Menjaga kebersihan dan keamanan laboratorium selama berada di dalam laboratorium
2. Mematikan lampu ruangan dan AC jika tidak dipergunakan
3. Menjaga kebersihan dan keamanan serta bertanggung jawab terhadap alat-alat laboratorium selama penggunaan alat tersebut, jika ada alat yang rusak segera melaporkan kepada dosen atau asisten yang ditunjuk
4. Tidak boleh makan dan minum selama berada di laboratorium
5. Mengenakan baju yang sopan, jas laboratorium, dan sepatu selama di laboratorium
6. Wajib mengganti alat gelas/alat lain yang dirusakkan/dipecahkan
7. Membawa alat yang dibutuhkan selama praktikum (serbet, sabun etc)

### **TATA TERTIB KHUSUS UNTUK ANAK PENELITIAN**

1. Wajib mengisi formulir ijin penggunaan laboratorium.
2. Wajib memakai name tag setiap menggunakan laboratorium.
3. Wajib mengisi buku harian penggunaan alat laboratorium.
4. Jika diakhir masa penelitian di laboratorium fitokimia ada alat yang rusak / hilang (meskipun tidak memakai alat tersebut) maka wajib mengganti alat tsb secara bersama-sama dengan mahasiswa yang berada pada periode penelitian yang sama.
5. Setiap mahasiswa penelitian yang sudah menyelesaikan penggunaan fasilitas laboratorium dalam satu periode penelitian maka mahasiswa tsb harus segera menyelesaikan urusan administrasi peminjaman fasilitas laboratorium.

## DAFTAR ISI

	halaman
Halaman judul .....	i
Halaman lembar mahasiswa .....	ii
Kata pengantar .....	iii
Tata tertib laboratorium .....	iv
Daftar isi .....	iv
BAB I. PENANGANAN SIMPLISIA .....	1
BAB II. IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA KIMIA DENGAN REAKSI WARNA .....	3
BAB III. EKSTRAKSI .....	7
BAB IV. EVAPORASI (PENGUAPAN) .....	11
BAB V. FRAKSINASI .....	13
BAB VI. KROMATOGRAFI .....	15
BAB VII. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) .....	20
BAB VIII. PENETAPAN KADAR TANIN .....	24
BAB IX. PENETAPAN KADAR FLAVONOID .....	29
BAB X. PENETAPAN KADAR ALKALOID PIPERIN .....	31
BAB XI. ISOLASI PIPERIN .....	33
DAFTAR PUSTAKA .....	35

# **BAB I**

## **PENANGANAN SIMPLISIA**

### **1. Tujuan Praktikum**

- Mahasiswa dapat memahami penanganan simplisia
- Mahasiswa dapat menentukan derajat kehalusan serbuk

### **2. Pendahuluan**

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 simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia mineral (pelikan). 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 (Depkes 1986).

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)

#### **Pembuatan serbuk**

Proses pembuatan ekstrak diawali dengan proses pengeringan dan pembuatan serbuk simplisia kering. Proses pengeringan dan penyerbukan (pembuatan serbuk) dapat mempengaruhi mutu ekstrak.

Proses pengeringan dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu proses pengeringan di udara terbuka tetapi tidak dibawah sinar matahari langsung dan pengeringan dengan oven pada suhu 45° – 50° C.

Penyarian (ekstraksi) pada prinsipnya adalah peristiwa pemindahan massa. Zat aktif yang semula berada di dalam sel akan ditarik oleh pelarut (cairan penyari) sehingga terjadi larutan zat aktif dalam cairan pelarut tsb. Pada umumnya proses penyarian akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia yang akan bersentuhan (berkontak) dengan cairan pelarut semakin luas. Proses pembuatan serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan kontak antara cairan penyari dengan pelarut.

Simplisia ada yang bersifat lunak seperti rimpang, daun, akar dan ada yang bersifat keras seperti biji, kulit kayu, kulit akar. Simplisia yang lunak

mudah ditembus oleh pelarut sehingga tidak diperlukan proses penyerbukan hingga halus, sebaliknya pada simplisia yang keras diperlukan proses penyerbukan hingga halus.

### **3. Alat dan Bahan**

- **Alat** : pisau (pemotong), wadah tahan panas, oven, blender, toples, ayakan
- **Bahan** : simplisia

### **4. Prosedur kerja**

#### **a. Penanganan simplisia**

- Kumpulkan bahan tumbuhan segar yang anda ambil, lalu sortasi basah
- Timbang berat bahan tumbuhan segar tersebut
- Cuci, lalu rajang dengan menggunakan pisau/pemotong, keringkan, lalu sortasi kering
- Timbang simplisia kering yang diperoleh
- Simpan simplisia pada wadah kering tertutup rapat.

#### **b. Penetapan derajat kehalusan serbuk**

- Rajang simplisia kering sesuai dengan ukuran yang akan digunakan
- Pembuatan serbuk dapat dilakukan dengan bantuan blender
- Ayak dengan nomor ayakan yang sesuai

### **5. Tugas pendahuluan**

1. Deskripsikan dan jabarkan klasifikasi simplisia yang saudara gunakan sebagai sampel!
2. Buatlah skema (bagan kerja) cara pembuatan simplisia yang saudara gunakan!
3. Perhatikan khusus apa yang harus dilakukan pada saat perajangan sampel saudara?
4. Jelaskan faktor-faktor yang mempengaruhi zat aktif yang terkandung dalam simplisia!
5. Apa yang terjadi jika serbuk simplisia terlalu halus ketika diekstraksi?

## BAB II IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA KIMIA DENGAN REAKSI WARNA

### 1. Tujuan praktikum

- Mahasiswa dapat mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder dalam simplisia dengan reaksi warna

### 2. Pendahuluan

Flavonoid terdapat dalam banyak tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal alam jaringan tumbuhan. Flavonoid merupakan senyawa fenol, karena itu warnanya akan berubah jika ditambah dengan basa atau amonia.

Saponin adalah glikosida triterpen, dan bersifat seperti sabun serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah.

Alkaloid berarti senyawa bersifat basa, berasal dari tumbuhan dan hewan, umumnya memiliki sistem cincin heterosiklik (tidak semua anggota cincin memiliki nitrogen). Sering memiliki aktivitas biologis pada manusia dan hewan.

Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Cara untuk mendeteksi senyawa fenol secara sederhana yaitu dengan menambahkan larutan besi (III) klorida yang akan menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.

### 3. Alat dan bahan

- **Alat:** Pisau (pemotong), oven, waterbath, tabung reaksi, corong, wadah tahan panas, pipet
- **Bahan:** Simplisia, kloroform 0,05 N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, pereaksi Mayer, metanol, logam Mg, etanol, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi Liebermann Burchard, aquadest, larutan 0,1 % nin hidrin-aseton

### 4. Prosedur kerja

#### a. Identifikasi metabolit primer

##### 1) Identifikasi asam amino

- Larutan percobaan ditambah dengan larutan 0,1 % nin hidrin-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

- 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.

## 2) Identifikasi karbohidrat

- 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.
- 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

## 3) Identifikasi asam lemak

- 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
- Larutan sampel ditambahkan larutan 2',7'-diklorofluorosein 0,2% dalam etanol akan menimbulkan fluoresensi warna hijau muda pada latar belakang ungu pada sinar UV.

## b. Identifikasi metabolit sekunder

### 1) Identifikasi fenol

Preparasi: Serbuk simplisia 2 gram dalam Erlenmeyer ditambahkan 10 ml HCL 2M, dipanaskan di atas tangas air selama 30 menit. Disaring, filtrate dimasukkan dalam corong pisah. Perlakuan dilakukan sebanyak 2x. Filtrat kemudian ditambahkan dengan 20 ml eter, dikocok biarkan keduanya memisah. Larutan eter dipisahkan, diuapkan hingga sisa sekitar 5 ml. Larutan ini bisa digunakan untuk uji reaksi warna dan uji KLT.

- Larutan uji 1 ml ditambahkan dengan pereaksi folin ciocalteu dipanaskan sebentar di atas tangas air akan terjadi warna biru
- Larutan uji 1ml ditambahkan larutan vanillin asam klorida pekat akan timbul warna

- Larutan uji ditambahkan 5 ml  $\text{FeCl}_3$  maka akan terbentuk warna ungu
- Tes daya reduksi :  
0,5 ml ekstrak (larutan uji) ditambahkan 0,5 ml fehling A dan 0,5 ml fehling B dipanaskan, maka akan terbentuk endapan merah bata.

## 2) Identifikasi tanin

Preparasi: Serbuk simplisia (2 gram) diekstraksi dengan etanol 80% (30 ml), menggunakan pendingin tegak selama 15 menit. Filtrat yang diperoleh diuapkan diatas penangas air. Pada sisa penguapan ditambahkan aquadest panas dan diaduk. Setelah dingin, larutan disentrifugasi, cairan diatasnya dipisahkan dengan cara dekantasi, dan larutan ini digunakan sebagai larutan uji.

- Larutan uji ditambahkan larutan 10% gelatin akan timbul endapan putih
- 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.
- Larutan uji ditambah dengan 3% besi (III) klorida akan terjadi warna hijau, biru hingga hitam.
- pH larutan uji dibuat sekitar 3-6, jika perlu dengan penambahan  $\text{NaHCO}_3$  atau asam asetat encer. Larutan kemudian ditambahkan larutan Pb (II) asetat 25% atau larutan striknin nitrat akan timbul endapan.

## 3) Identifikasi flavonoid

Preparasi: Pembuatan larutan uji dengan menyari serbuk simplisia (5 gram) dengan metanol sebanyak 30 ml. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan hingga kental, kemudian ditambahkan air panas. Ekstrak yang diperoleh kemudian disari menggunakan pelarut non polar dan sisanya disari dengan menggunakan etil asetat (20 ml) diulang sebanyak 3x. Ekstrak etil asetat digunakan sebagai larutan uji.

- 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.
- Uji dilakukan seperti diatas, tetapi serbuk Mg diganti Zn. Hanya senyawa dihidroflavonol yang menimbulkan warna merah

hingga merah lembayung. Flavanon dan flavanonol tidak berwarna atau warna merah muda.

- Reaksi Wilson-Taubock: Larutan uji 1 ml diuapkan, kemudian ditambahkan aseton beberapa tetes, lalu ditambahkan sedikit serbuk asam borat dan asam oksalat, selanjutnya dikeringkan. Residu dilarutkan dalam 10 ml eter yang kemudian dilihat pada sinar UV 365 nm. Warna hijau kuning yang timbul menunjukkan adanya senyawa flavonoid.
- Penambahan  $\text{FeCl}_3$ . Flavonoid yang memiliki gugus hidroksil bebas pada cincin A atau B akan menimbulkan warna hijau biru setelah penambahan larutan ini.

#### 4) Identifikasi alkaloid

Preparasi: serbuk simplisia 5 gram dengan metanol sebanyak 30 ml. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan hingga kental, kemudian ditambahkan dengan kloroform, lalu gunakan sebagai larutan uji

- Larutan uji sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan 1,5 mL asam klorida 2%. Larutan kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung I ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer, dan tabung II ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terjadinya endapan berwarna putih kekuningan pada penambahan pereaksi Mayer dan endapan berwarna jingga kecoklatan pada penambahan pereaksi Dragendorff.

### 5. Tugas Pendahuluan

1. Apa yang dimaksud dengan metabolit primer dan metabolit sekunder?
2. Sebutkan masing-masing dua contoh senyawa yang termasuk dalam metabolit primer dan sekunder!
3. Bagaimana cara identifikasi untuk alkaloid, flavonoid, dan tanin?

## **BAB III EKSTRAKSI**

### **1. Tujuan praktikum**

- Mahasiswa dapat mengetahui berbagai cara ekstraksi
- Mahasiswa dapat mengekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai

### **2. Pendahuluan**

Ekstraksi atau penyarian merupakan suatu proses penarikan senyawa-senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan, hewan dan lain-lain menggunakan pelarut tertentu.

Simplisia ada yang lunak seperti rimpang, daun, akar kelembak dan ada yang keras seperti biji. Kulit kayu, kulit akar. Simplisia yang lunak mudah di tembus cairan penyarian oleh karena itu pada penyarian perlu di serbuk sampai halus. Sebaliknya pada simplisia yang keras, perlu di haluskan terlebih dahulu sebelum di lakukan penyarian.

Proses ekstraksi dapat di pisahkan menjadi: pembuatan serbuk, pembasahan, penyarian dan pemekatan. Teknik yang umum untuk ekstraksi senyawa kimia adalah cara maserasi, sokletasi, perkolasi dan perebusan.

Maserasi merupakan proses penyarian sederhana, yaitu dengan merendam sampel dalam pelarut yang sesuai selama 3-5 hari. Pelarut akan menembus kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam 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. Keuntungan dari metoda maserasi yaitu, teknik pengerjaan dan alat yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil.

Sokletasi merupakan teknik penyarian dengan pelarut organik menggunakan alat soklet. Pada cara ini pelarut dan sampel ditempatkan secara terpisah. Prinsipnya adalah penyarian yang dilakukan berulang-ulang sehingga penyarian lebih sempurna dan pelarut yang digunakan relatif lebih sedikit. Tapi metoda sokletasi ini tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa termolabil.

Perkolasi merupakan teknik penyarian dengan pelarut organik menggunakan alat perkolator. Pada cara ini pelarut dialirkan melewati sampel sehingga penyarian lebih sempurna. Tapi metoda ini membutuhkan pelarut yang relatif lebih banyak.

Perebusan merupakan teknik penyarian menggunakan pelarut air. Pada cara ini sampel direndam dengan pelarut kemudian dipanaskan

sampai mendidih. Metoda perebusan 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.

Farmakope Indonesia menetapkan bahwa sebagai cairan penyari adalah air, etanol, air-etanol atau eter. Pemilihan cairan penyari juga harus mempertimbangkan banyak faktor, yaitu :

- murah dan mudah di peroleh,
- stabil secara fisik dan kimia,
- bereaksi netral
- tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar
- selektif
- tidak memperngaruhi zat berkhasiat, dan
- di perbolehkan dalam peraturan.

Selanjutnya larutan ekstrak dapat dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Untuk dapat mengelompokkan senyawa menjadi lebih sederhana lagi maka bisa dialnjutkan dengan proses fraksinasi dan proses pemurnian lebih lanjut agar didapatkan senyawa kimia tertentu yang dikandung oleh simplisia.

### 3. Alat dan bahan

- **Alat:** Toples, wadah untuk maserat, batang pengaduk, ayakan, kain/ pembungkus warna gelap, alat soklet percolator, Rotary Evaporator
- **Bahan:** Simplisia, pelarut, aquadest, es batu.

### 4. Prosedur kerja

#### a. Penetapan derajat kehalusan serbuk

- Rajang sampel sesuai dengan ukuran yang akan di gunakan dalam metode praktikum saudara
- Haluskan dengan menggunakan blender
- Ayak dengan No.ayakan yang sesuai

#### b. Ekstraksi

##### 1) Maserasi

- Masukkan 100 gram serbuk simplisia dalam toples, kemudian rendam dengan pelarut (sampai serbuk terendam semua maximum 300 ml) sampai terendam
- Tutup toples dengan kain atau kertas pembungkus warna gelap
- Aduk minimal 2 kali dalam sehari
- Setelah 2 hari pisahkan antara sari dengan ampasnya dengan kertas saring
- Tampung hasil ekstrak

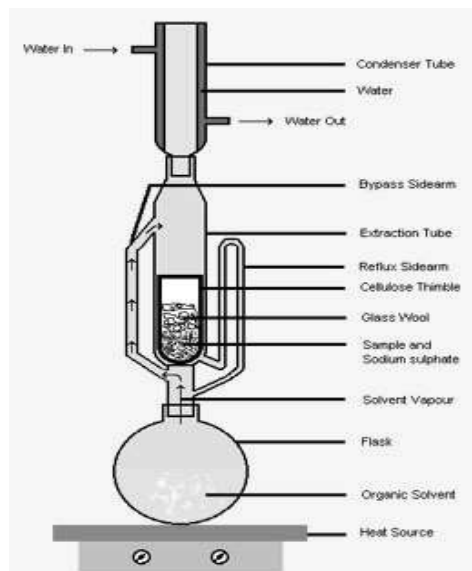
## 2) Perkolasi

- Siapkan alat perkolator
- Masukkan 50 gram serbuk simplisia dalam bejana silinder pada percolator. Basahi serbuk dengan penyari secara merata.
- Tambahkan cairan penyari di cairkan dari atas sampai ke bawah melalui serbuk tersebut
- Atur kecepatan penetesan cairan
- Tampung hasil ekstrak
- Lakukan sampai seluruh sari terlarut

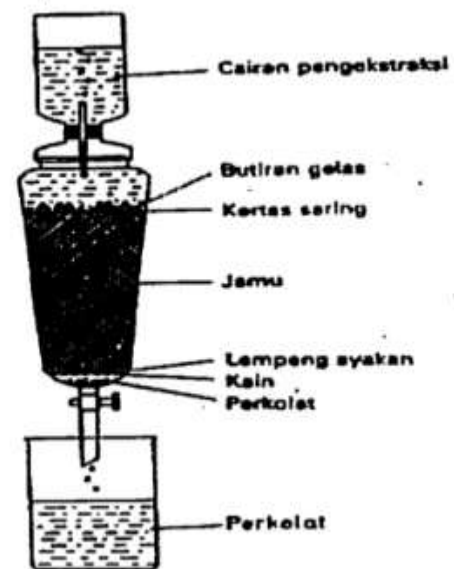
## 3) Sokletasi

- Rangkailah alat soxhlet sesuai dengan gambar di bawah
- Masukkan serbuk simplisia (25 gram) ke dalam alat soklet dengan di bungkus oleh kertas saring
- Masukkan sejumlah pelarut (1,5 kali sirkulasi, volume tergantung ukuran soxhlet)
- Biarkan proses pelarutan/ penyarian berlangsung, tunggu sampai seluruh sari terlarut, dengan diliat cairan penyari telah jernih pada bejana soxhlet atau dengan mengecek keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam alat soxhlet.
- Tampung hasil ekstrak

### c. Rangkaian alat



(A). Rangkaian alat soxhlet



(B). Rangkaian alat soxhlet

## **5. Tugas Pendahuluan**

1. Faktor apakah yang mempengaruhi kecepatan penyarian?
2. Jelaskan keuntungan dan kerugian dari masing-masing metode ekstraksi?
3. Jelaskan faktor-faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak?
4. Berdasarkan percobaan yang telah anda lakukan, berikan alasan mengenai pemilihan metode dan pelarut yang anda gunakan!

## **BAB IV**

### **EVAPORASI (PENGUAPAN)**

#### **1. Tujuan Praktikum**

- Mahasiswa dapat melakukan proses penguapan pelarut dari hasil ekstraksi
- Mahasiswa dapat memahami prinsip kerja *rotary evaporator*
- Mahasiswa dapat menghitung rendemen ekstrak hasil ekstraksi

#### **2. Pendahuluan**

##### **Penguapan**

Penguapan hasil ekstraksi yang masih mengandung banyak pelarut atau disebut juga proses pemekatan bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi senyawa lebih besar dan untuk memudahkan penyimpanan. 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.

Proses penguapan dapat dilakukan dengan berbagai alat yaitu dengan menggunakan :

- 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.
- 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.
- 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. Keuntungan penggunaan alat ini adalah waktu yang dibutuhkan lebih cepat dan kemungkinan terjadinya penguraian senyawa yang termolabil dapat dihindari.

##### **Pengeringan**

Ekstrak kental yang diperoleh dari proses penguapan dapat dilanjutkan dengan proses pengeringan. Ekstrak kering dimaksudkan agar stabilitas senyawa lebih terjamin. Proses pengeringan dapat dilakukan dengan menggunakan alat pengering vakum, pengering beku (*freeze dryer*) pada suhu rendah atau beku 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.

### 3. Alat dan bahan

- **Alat** : *rotary evaporator*, wadah gelas bertutup, kertas saring/kapas, waterbath, cawan penguap
- **Bahan** : ekstrak cair hasil ekstraksi

### 4. Prosedur kerja

#### a. Pemekatan dengan *rotary evaporator*

- Masukkan ekstrak cair hasil ekstraksi ke dalam labu
- Masukkan air ke dalam *waterbath* secukupnya, atur suhu air di dalam *waterbath* pada 40-50°C
- Nyalakan speaker evaporator dengan menekan tombol ON pada stop kontak
- Tekan tombol pengatur untuk memutar labu
- Tunggu hingga proses berakhir dan cairan penyari telah teruapkan, usahakan tidak terlalu pekat agar memudahkan dalam proses pengambilan (menuangkan) ekstrak kental dalam labu.

#### b. Pengamatan hasil ekstraksi

- Lakukan pengamatan organoleptik terhadap ekstrak kental yang telah diperoleh berupa bentuk, warna, bau, dan rasa.
- Hitung rendemen ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{berat simplisia kering yang digunakan untuk ekstraksi}} \times 100\%$$

### 5. Tugas Pendahuluan

1. Apa tujuan dilakukan pemekatan dan pengeringan ?
2. Jelaskan prinsip kerja dari *rotary evaporator* ?
3. Apa tujuan dilakukan penghitungan rendemen?

## **BAB V FRAKSINASI**

### **1. Tujuan praktikum**

- Mahasiswa dapat memisahkan golongan-golongan yang ada pada simplisia

### **2. Pendahuluan**

Fraksinasi merupakan proses pemisahan antara zat cair dengan zat cair. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar, dan polar. 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). Pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada diatas (Adijuwana dan Nur 1989).

Corong pemisah berbentuk kerucut yang ditutupi setengah bola. Ia mempunyai penyumbat di atasnya dan keran di bawahnya. Corong pemisah 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.

Kendala pada fraksinasi adalah pembentukkan 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.

Penambahan asam akan merubah ion karboksil pada surfaktan menjadi asam karboksilat menyebabkan tetesan minyak beraglomerasi.

### 3. Alat dan bahan

- **Alat:** Corong pisah, gelas ukur, Erlenmeyer, botol vial
- **Bahan:** Ekstrak, aquades, etil asetat, *n*-heksana

### 4. Prosedur kerja dengan corong pisah

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

### 5. Tugas Pendahuluan

1. Jelaskan prinsip kerja fraksinasi !
2. Jelaskan syarat pelarut yang dapat digunakan untuk fraksinasi !
3. Sebutkan 3 contoh pelarut yang bersifat !
  - a. Nonpolar
  - b. Semipolar
  - c. Polar

## **BAB VI KROMATOGRAFI**

### **1. Tujuan praktikum**

- Mahasiswa dapat memisahkan golongan-golongan senyawa yang ada pada simplisia

### **2. Pendahuluan**

#### **Definisi**

Kromatografi adalah tehnik pemisahan dimana senyawa atau sampel yang dipisahkan terdistribusi diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (mobil). Terdapat tiga jenis kromatografi yaitu kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom serta kromatografi cair kinerja tinggi dengan kekuatan dan kelemahannya masing-masing.

Kromatografi kolom adalah salah satu metoda yang sangat baik untuk pemisahan dan pemurnian pada pemisahan suatu padatan atau cairan. Jenis pemisahan pada kromatografi kolom bisa berupa adsorpsi (padat/cair) atau partisi (cair/cair). Fase diam adalah suatu adsorben padat ditempatkan pada suatu kolom kaca vertical dan fasa gerak ditambahkan dari bagian atas kolom dan dibiarkan mengalir melalui kolom dengan gaya gravitasi atau adanya tekanan dari luar. Adsorben yang dapat digunakan adalah silika gel G-60, alumina ( $Al_2O_3$ ) atau diaion. Cara pembuatan kromatografi kolom ada dua macam, yaitu :

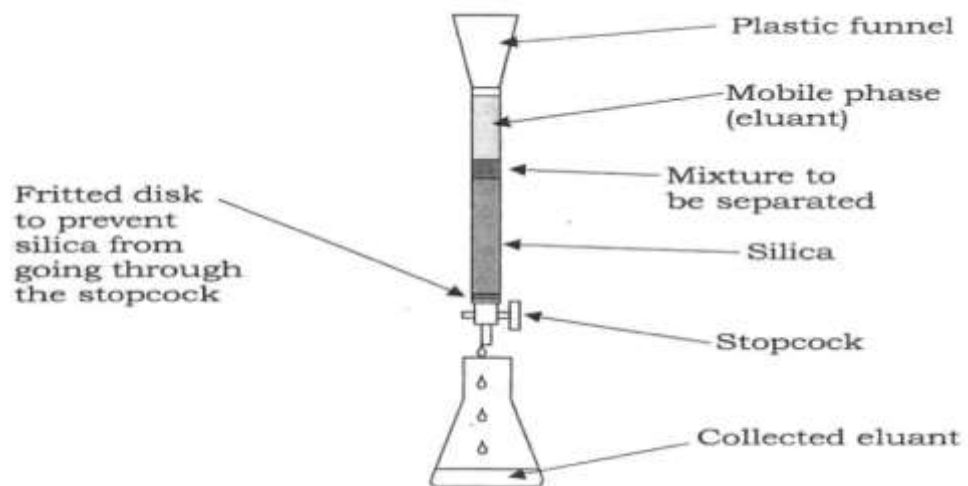
- **Cara kering**

Silika gel atau adsorben dimasukkan dalam kolom yang telah diberi kapas sebelumnya pada ujung kolom. Selanjutnya cairan pengelusi dialirkan melalui silika.

- **Cara basah**

Masukkan kapas dibagian ujung kolom. Silika terlebih dahulu disuspensikan dengan cairan pengelusi yang digunakan kemudian dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom secara kontinu sedikit demi sedikit hingga masuk semua sambal bagian keran dibuka. Eluen dibiarkan mengalir hingga silika menjadi kompak dan mampat, setelah terlihat kompak atau mampat eluen dibiarkan mengalir hingga menyisakan bagian atas adsorben untuk peletakan sampel.

Jumlah silika yang diperlukan sebagai fasa diam kromatografi kolom tergantung pada tingkat pemisahan yang diinginkan. Untuk tahap pemurnian biasanya diperlukan kolom yang lebih panjang sehingga silika untuk fasa diam diperlukan lebih banyak. Biasanya jumlah silika yang digunakan sebagai fasa diam adalah sebanyak 10-50 kali jumlah ekstrak sampel.



Skema alat kromatografi kolom  
 (sumber: <http://www.odinity.com/wp-content/uploads/2013/11/column-chromatography-1.png>)

### Penyiapan sampel

Terdapat dua macam cara penyiapan sampel pada kromatografi kolom.

1. Sampel yang telah dilarutkan dengan cairan pengelusi dan dipipet untuk diletakkan pada bagian atas adsorben.
2. Sampel dicampur dengan cairan fasa diam dengan jumlah sama banyak lalu didispersikan di atas adsorben.

Sampel yang telah diletakkan diatas permukaan adsorben lalu dielusi dengan fasa gerak secara perlahan melalui dinding kolom dan keran dibuka. Fasa gerak atau eluen yang digunakan bisa merupakan satu pelrut saja atau campuran dari dua macam pelarut dengan perbandingan yang tertentu dan kepolaran yang berbeda. Sistem elusi pelarut dapat dibagi menjadi dua macam yaitu :

1. Elusi Isokratik

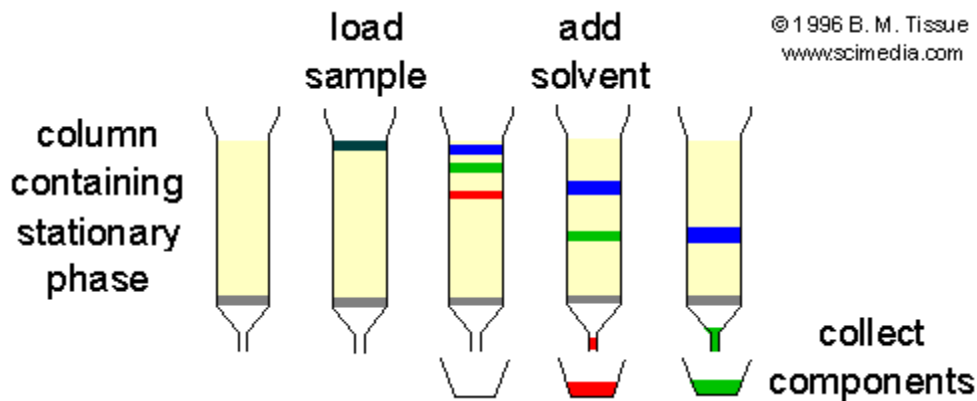
Selama proses elusi menggunakan fasa gerak dengan polaritas yang tetap

2. Elusi Bertahap

Selama proses elusi menggunakan fasa gerak dengan kepolaran meningkat secara bertahap (*Step Gradient Polarity*) pada kolom fasa normal dengan adsorben silika. Sedangkan pada kolom fasa terbalik (*reverse phase*) dengan fasa diam silika C-18, kepolaran menurun secara bertahap. Variasi kepolaran dibuat dengan cara memvariasikan komposisi fasa gerak.

Proses elusi dihentikan jika sudah tidak lagi sampel yang dapat dibawa keluar lagi oleh fasa gerak yang dapat dideteksi dari warna fraksi yang

keluar dari kolom atau dengan mendeteksinya menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Setiap fraksi yang keluar dari kromatografi kolom dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) lalu dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan 365 nm atau menggunakan pereaksi semprot. Fraksi yang memiliki jarak pola KLT yang mirip digabungkan.



Skema Pemisahan Komponen Sampel pada Kromatografi Kolom  
(<http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/graphics/lc-schem.gif>)

### 3. Alat dan bahan

- **Alat:** Gelas ukur, erlenmeyer, botol vial, kapas, kromatografi kolom
- **Bahan:** ekstrak,  $H_2SO_4$ , *n*-heksana,  $CHCl_3$ , etil asetat, metanol

### 4. Prosedur kerja dengan kromatografi kolom

#### a. Penyiapan sampel

##### 1) Cara 1: Pembuatan bubuk preabsorpsi

- Fraksi kental sampel dengan jumlah 1 gram dicampur dengan fasa diam yaitu silika gel dengan jumlah sama banyak atau campuran ekstrak dan silika menjadi kering berbentuk serbuk
- Keringkan hingga pelarut menguap dan campuran ekstrak dan silika menjadi berbentuk serbuk
- Sampel yang sudah siap diletakkan merata di atas silika yang telah di *packing* di kolom
- Usahakan bagian sampel tidak tebal agar mendapatkan pemisahan yang baik.
- Sampel ini digunakan untuk cara kolom kering

- ##### 2) Cara 2: Sampel yang telah kental dilarutkan dengan sejumlah kecil eluen jika perlu dipanaskan di *waterbath*. Lalu larutan tersebut diletakkan di atas silika yang telah di *packing* di kolom atau perlahan-lahan melalui dinding. Usahakan bagian sampel dibuat tidak tebal agar mendapatkan pemisahan yang baik. Cara preparasi ini digunakan untuk sampel yang basah.

## **b. Penyiapan kolom**

### **1) Cara Kering**

- Letakkan kapas atau *cotton wool* di bagian dasar kolom
- Siapkan sejumlah tertentu silika untuk kolom yaitu sebanyak 20 kali jumlah sampel ( 1 gram fraksi kental, jadi silika sekitar 20 gram)
- Masukkan silika kedalam kolom
- Masukkan perlahan melalui dinding cairan elusi
- Sambal kolomm diketuk-ketuk perlahan untuk mencegah terbentuknya gelembung udara yang dapat memecah kolom dan keran terbuka, pelarut yang keluar ditampung
- Masukkan sampel kemudian ditambahkan eluen masing-masing sebanyak 100 ml

### **2) Cara basah**

- Letakkan kapas atau *cotton wool* di bagian dasar kolom
  - Siapkan sejumlah tertentu silika untuk kolom yaitu sebanyak 20 kali jumlah sampel
  - Basahkan silika gel dengan pelarut pengelusi, diamkan beberapa saat
  - Masukkan silika basah perlahan kedalam kolom menggunakan corong sambil kolom digetok perlahan untuk mencegah terbentuknya gelembung udara yang dapat memecah kolom dan keran terbuka, pelarut yang keluar ditampung
  - Setelah dilihat kolom sudah terbentuk sempurna, lalu sampel bisa dimasukkan
  - Ditambahkan eluen masing-masing sebanyak 100 ml
- c. Hasil kromatografi di tampung kedalam vial, Untuk dapat hasil pemisahan yang baik maka tampung sebanyak 2/3 volume vial.
- d. Elusi kromatografi bisa dihentikan jika warna cairan pelarut yang keluar sudah lebih bening atau dengan mentotolkan cairan pelarut yang keluar pada plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis) lalu dilihat di bawah UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm dan dengan reagen semprot H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%. Apabila tidak terlihat adanya bercak dengan dua perlakuan tersebut maka proses kromatografi kolom bisa dihentikan
- e. Hasil pemisahan kromatografi kolom yang telah ditampung dalam vial dimonitor menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
- f. Sampel yang memiliki pola KLT yang sama dikelompokkan.

## 5. Tugas Pendahuluan

1. Apa yang dimaksud dengan kromatografi?
2. Jelaskan prinsip kerja kromatografi kolom?
3. Apa yang terjadi jika pada tahap pemurnian senyawa kimia, kita menampung hasil kromatografi kolom dengan volume yang terlalu banyak



## BAB VII KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)

### 1. Tujuan praktikum :

- Mahasiswa dapat mengidentifikasi kandungan senyawa yang terdapat dalam simplisia dengan cara Klt dengan menggunakan pereaksi semprot

### 2. Pendahuluan

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, sefadek 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 tampak atau sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366. Jarak rambat senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan nilai  $R_f$  (*retardation factor*) atau  $hR_f$  (*hundred retardation factor*).

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

Nilai  $R_f$  yang diperoleh selalu berupa pecahan dan akan lebih mudah jika  $R_f$  dikalikan dengan 100 yang dinyatakan dengan  $hR_f$ .

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

### 3. Alat dan bahan

- **Alat:** Lempeng kromatografi, rak penyimpanan (untuk meletakkan lempeng bial diperlukan pemanasan untuk mengaktifkan fase gerak), bejana kromatografi (chamber), Pipet mikro (micro-syringe), alat penyemprot pereaksi, lampu UV 254 dan 366 nm
- **Bahan:** Fase gerak, pereaksi semprot, bahan uji.

### 4. Prosedur kerja

- Larutan bahan uji (ekstrak, hasil salah satu fraksi dan hasil kromatografi kolom) dan /pembanding yang sudah disiapkan di totolkan pada lempeng (jarak penotolan 1-1,5 cm) dengan volume tertentu. Dan diberikan jarak 1,5-2 cm dari tepi bawah lempeng (batas bawah). Diameter totolan dibiarkan mengering. Pada jarak yang dikehendaki diberi tanda (batas atas)
- Lempeng dimasukkan dalam bejana (yang telah jenuh dengan fase gerak), dengan posisi tegak dan bagian tepi bawah tercelup dalam fase gerak, tetapi totolan tidak sampai terendam.
- Bejana ditutup rapat dan fase gerak dibiarkan merambat hingga batas jarak rambat.
- Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di udara. Perhatikan bercak yang timbul pada sinar tampak, UV 254 dan 366nm.
- Diukur dan dicatat jarak rambat setiap bercak yang timbul.
- Hitung nilai R<sub>f</sub> dan atau R<sub>x</sub> (R<sub>x</sub>= jarak rambat bercak dibagi jarak rambat pembanding)
- 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.

Note : apabila dilakukan KLT dua (2) arah, sebelum dimasukkan pada fase gerak kedua, lempeng dikeringkan dulu dari fase gerak pertama.

### 5. Contoh identifikasi kandungan senyawa dengan KLT

#### a. Senyawa fenol

- Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
- Fase gerak : toluen:aseton:asam format (6:6:1)
- Larutan deteksi : 5% larutan besi (III) klorida
- Pengamatan : sinar tampak

#### b. 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 metanol atau larutan sitroborat (pengamatan dengan pemanasan)
  - Pengamatan : sinar tampak dan UV 366 nm
  - Pembandingan : queresetin/rutin
- c. Senyawa Alkaloid
- Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : kloroform : metanol (95:5)
  - Larutan deteksi : Dragendorf, pereaksi iodoplatinat, asam sulfat dalam etanol 10%
  - Pengamatan : sinar tampak dan UV 366 nm
  - Pembandingan : piperin
- d. 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 366 nm
  - Pembandingan : aloin, skopoletin
- e. Senyawa minyak atsiri
- Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : benzene : kloroform (1:1) atau benzene : etil asetat (19:1)
  - Larutan deteksi : asam sulfat 5% dalam metanol atau larutan anisaldehyd-asam sulfat
  - Pengamatan : sinar tampak dan UV 366
- f. 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-burchard (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 vanilkin-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.
    - Perbandingan : karotenoid
- g. Senyawa glikosida jantung
- Fase diam : lempeng silika gel 60 F<sub>254</sub>
  - Fase gerak : etil asetat : methanol : 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. Tugas Pendahuluan

1. Apakah yang dimaksud dengan KLT?
2. Apakah yang dimaksud dengan fase diam dan fase gerak dalam KLT?
3. Sebutkan keuntungan dan kerugian KLT!
4. Pereaksi semprot apa yang digunakan untuk identifikasi senyawa fenol, flavonoid, alkaloid, saponin dan minyak atsiri?

## **BAB VIII**

### **PENETAPAN KADAR TANIN**

#### **1. Tujuan Praktikum**

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

#### **2. Pendahuluan**

Tanin merupakan senyawa polifenol. Tanin dibedakan atas 2 kelompok, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Proses ekstraksi tanin dapat dilakukan dengan metanol, etanol, air atau campuran etanol-air. Pada 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:

##### **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.

#### **3. Alat dan Bahan**

- **Alat:** Erlenmeyer, gelas ukur, corong, tabung reaksi, gelas kimia, labu ukur, pipet volume, pipet tetes, kertas aluminium foil, buret, statif dan klem, kertas saring, spektrofotometer UV Vis, kuvet, timbangan, 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 teh. Asam galat baku, katekin baku, asam oksalat  $\text{H}_2\text{O}$ , aquades,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N,  $\text{FeCl}_3$  3%, indikator indigosulfonat, etanol 70%, etanol 95%, ammonium ferri sulfat, vanillin 10% dalam etanol 95%, HCl pekat, pereaksi Folin Ciocalteu, natrium karbonat 15%.

#### 4. Prosedur kerja

##### 1). Penetapan kadar tanin secara Permanganometri

###### a). Pembakuan larutan baku primer asam oksalat

- Ditimbang asam oksalat  $2\text{H}_2\text{O}$  sebanyak  $\pm 0,6938$  g, dilarutkan dengan aquades secukupnya.
- Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, lalu ditambahkan aquades sampai tanda batas pada labu ukur.
- Dihitung normalitas (N) asam oksalat  $2\text{H}_2\text{O}$

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

- Dipipet 10 ml larutan baku asam oksalat  $2\text{H}_2\text{O}$  0,1 N.
- Dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml, ditambahkan 10 ml larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N, dipanaskan sampai suhu  $70^\circ\text{C}$ , kemudian dititrasi dengan  $\text{KMnO}_4$  0,1 N.
- Titrasi dihentikan apabila sudah terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi berwarna merah muda
- Catat volume  $\text{KMnO}_4$  yang digunakan selama titrasi. Hitung normalitas (N)  $\text{KMnO}_4$

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

- Serbuk simplisia ditimbang seksama 2 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 indigosulfonat.

- Titrasi larutan 0,1 N  $\text{KMnO}_4$  hingga terjadi perubahan warna dari biru tua menjadi larutan berwarna kuning emas.
- Dicatat volume  $\text{KMnO}_4$  yang digunakan.
- Kadar tanin dihitung dengan kesetaraan 1 ml 0,1 N  $\text{KMnO}_4$  setara dengan 0,004157 g tanin.

**d) Pengukuran blanko**

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

**2). Kadar tanin dihitung sebagai katekin secara spektrofotometri**

**a) Larutan pembanding**

- Katekin 100 mg dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam labu ukur (sebagai larutan induk).

**b) Larutan uji**

- Serbuk simplisia ditimbang seksama 2 g
- Serbuk disari dengan 20 ml etanol 70%, lalu dipanaskan dengan selama 30 menit, dan disaring
- Penyarian diulang hingga larutan memberikan reaksi negatif terhadap larutan ammonium ferri sulfat.
- Filtrat dikumpulkan dalam labu ukur 100 ml dan volume dicukupkan dengan etanol 70% hingga tanda batas

**c) Larutan blanko**

- Pipet 1 ml etanol 70% dan masukkan ke dalam labu ukur 10 ml
- Tambahkan 5 ml pereaksi vanillin 10%, kocok, diamkan  $\pm 3$  menit.
- Tambahkan 10 ml HCl pekat dan cukupkan volume sampai tanda batas dengan etanol 95%. Kocok, diamkan selama 20 menit.

**d) Pembuatan kurva baku**

- Buatlah 5 seri konsentrasi dari larutan induk katekin.
- Tambahkan 5 ml pereaksi vanillin 10%, kocok, diamkan  $\pm 3$  menit.
- Tambahkan 10 ml HCl pekat dan cukupkan volume sampai tanda batas dengan etanol 95%. Kocok, diamkan selama 20 menit.
- Ukur serapan pada panjang gelombang maksimum (530 nm). Buat persamaan regresinya dan hitung nilai r.

**e) Pengukuran kadar**

- Larutan uji dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, ditambahkan 1 ml pereaksi vanillin 10% (dalam etanol 95%) dan 1 ml HCl pekat, hangatkan dalam penangas air, lalu tambahkan etanol 95% hingga tanda batas, diamkan 20 menit.
- Serapan diukur pada panjang gelombang (530 nm)
- Perhitungan kadar tanin dihitung dalam % (b/b) terhadap pembanding katekin dilakukan menggunakan persamaan regresi.

### **3). Kadar tanin dihitung sebagai fenol total secara spektrofotometri**

#### **a) Larutan pembanding**

- Asam galat 10 mg dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam labu ukur (sebagai larutan induk).

#### **b) Larutan uji**

- Serbuk simplisia ditimbang seksama 2 g
- Serbuk disari dengan 10 ml etanol 70%, sambil dikocok selama 30 menit, lalu disaring. Ulangi penyarian hingga senyawa fenol tersari sempurna.
- Filtrat dikumpulkan dalam labu ukur 100 ml dan dicukupkan dengan etanol 70% hingga tanda batas.

#### **c) Larutan blanko**

- Pipet 1 ml etanol 70% dan masukkan ke dalam labu ukur 10 ml
- Ditambahkan 5 ml pereaksi Folin ciocalteu, dihomogenkan secara perlahan selama 1 menit, kemudian ditambah 2 ml natrium karbonat 15% dicampur perlahan selama 1 menit.
- Volume dicukupkan hingga 10 ml dengan aquades, lalu dipindahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup dengan lembar aluminium dan dipanaskan dalam penangas air 50°C selama 5 menit.

#### **d) Pembuatan kurva baku**

- Buatlah 5 seri konsentrasi dari larutan induk asam galat, lalu masing-masing dimasukkan ke dalam 10 ml labu ukur, dan ditambahkan 5 ml pereaksi Folin Ciocalteu, dihomogenkan secara perlahan selama 1 menit, kemudian ditambah 2 ml natrium karbonat 15% dicampur perlahan selama 1 menit.
- Volume dicukupkan hingga 10 ml dengan aquades, lalu dipindahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup dengan lembar aluminium dan dipanaskan dalam penangas air 50°C selama 5 menit.



- Setelah dingin, ukur serapannya pada panjang gelombang 765 nm. Buat persamaan regresinya dan hitung nilai r.

**e) Pengukuran kadar**

- Larutan uji dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, ditambahkan 5 ml pereaksi Folin Ciocalteu, dihomogenkan secara perlahan selama 1 menit, kemudian ditambah 2 ml natrium karbonat 15% dicampur perlahan selama 1 menit.
- Volume dicukupkan hingga 10 ml dengan aquades, lalu dipindahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup dengan lembar aluminium dan dipanaskan dalam penangas air 50°C selama 5 menit.
- Serapan diukur pada panjang gelombang 765 nm. Perhitungan kadar fenol total dihitung dalam % (b/b) terhadap pembanding asam galat dilakukan menggunakan persamaan regresi.

**5. `Tugas Pendahuluan**

1. Jelaskan pengertian uji kuantitatif dan perbedaannya dengan uji kualitatif!
2. Jelaskan sifat fisika dan kimia dari senyawa tanin!
3. Jelaskan perbedaan tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi!
4. Berikan masing-masing contoh senyawa tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi! Serta gambarkan strukturnya!
5. Jelaskan keuntungan menggunakan metode spektrofotometri dibanding metode titrimetri!

## **BAB IX PENETAPAN KADAR FLAVONOID**

### **1. Tujuan Praktikum**

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

### **2. Pendahuluan**

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.

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.

### **3. 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.

### **4. Prosedur kerja penetapan kadar flavonoid dengan metode Chang**

#### **a). Pembuatan kurva baku**

- Kuersetin 10 mg dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam labu ukur (sebagai larutan induk).
- buatlah 5 larutan seri konsentrasi dari larutan induk dalam labu ukur 10 ml.
- tambahkan masing-masing larutan seri konsentrasi tersebut dengan metanol hingga tanda batas.

- 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.
- larutan dikocok dengan baik dan dibiarkan bereaksi selama 30 menit pada suhu ruang.
- Ukur serapan larutan tersebut pada panjang gelombang 425 nm.

**b). Penetapan kadar flavonoid**

- Serbuk simplisia 5 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambahkan 15 ml metanol, lalu dipanaskan 10 menit diatas penangas air, dinginkan, lalu saring.
- Buat campuran : 0,1 ml aluminium triklorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan 2,8 ml air suling.
- Masukkan campuran tadi ke dalam ekstrak metanol, dan biarkan bereaksi selama 30 menit dala suhu ruang.
- Percobaan larutan blanko : larutan uji tanpa penambahan pereaksi aluminium klorida.
- Ukur serapan larutan tersebut pada panjang gelombang 425 nm. kadar flavonoid total dinyatakan sebagai kuersetin.

**5. Tugas Pendahuluan**

1. Mengapa flavonoid dikelompokkan dalam senyawa polifenol?
2. Gambarkan struktur inti flavonoid!
3. Sebutkan dan jelaskan dua jenis glikosida flavonoid!
4. Apakah flavonoid dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut polaritas rendah seperti, kloroform dan eter? Jika ya, maka sebutkan jenis flavonoid tersebut!

## **BAB X**

### **PENETAPAN KADAR ALKALOID PIPERIN**

#### **1. Tujuan praktikum**

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

#### **2. Pendahuluan**

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder yang mengandung unsur nitrogen (N), yang biasanya pada cincin heterosiklis dan bersifat basa. Namun, tidak semua senyawa yang memiliki atom nitrogen merupakan suatu alkaloid, yaitu: asam amino, asam nukleat, nukleotida, porfirin, senyawa nitro dan nitroso.

Alkaloid dalam tumbuhan umumnya berbentuk garam dan bersifat larut dalam pelarut polar seperti etanol dan air. Namun, alkaloid juga terdapat dalam bentuk basanya sehingga alkaloid lebih larut dalam pelarut non polar seperti eter, benzene, toluen, dan kloroform.

Secara umum, penetapan kadar alkaloid dapat ditentukan secara gravimetric (cara ini sudah jarang digunakan), titrimetri, spektrometri, KLT-densitometri, dan KCKT. Alkaloid yang bersifat basa kuat dapat ditentukan dengan titrasi asam basa, sedangkan untuk alkaloid yang bersifat basa lemah lebih baik ditentukan secara titrasi bebas air.

#### **3. Alat dan bahan**

- **Alat** : toples, labu ukur 100 ml, labu ukur 10 ml, plat KLT GF<sub>245</sub>, pipa kapiler 5µl, chamber, TLC *scanner*
- **Bahan** : simplisia cabe jawa/lada, etanol 95%, piperin baku, *n*-heksana, etil asetat

#### **4. Prosedur kerja penetapan kadar piperin dengan metode KLT-densitometri**

- Simplisia ditimbang sebanyak 1 gram, dimaserasi dengan pelarut etanol 95% selama 30 menit, lalu saring dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan dengan etanol 95% hingga tanda batas.
- Larutan piperin baku dibuat dalam etanol 95% dengan 4 konsentrasi berbeda (untuk penentuan kurva baku)
- Masing-masing larutan baku dan larutan uji ditotolkan pada plat silika gel GF<sub>254</sub> sebanyak 5 µl pada lempeng yang sama.
- Elusi plat tersebut dengan fase gerak *n*-heksana:etil asetat (1:1)
- Serapan diukur pada panjang gelombang 254 nm.

- Kadar piperin dapat dihitung dalam % b/b dengan membandingkan kurva standar, dengan menggunakan rumus:

$$\text{kadar (\%)} = \frac{A_u}{A_p} \times \frac{C_p}{C_u} \times f \times 100$$

Keterangan:

$A_u$  = serapan larutan uji

$A_p$  = serapan larutan pembanding

$C_u$  = konsentrasi larutan uji

$C_p$  = konsentrasi larutan pembanding

$f$  = faktor pengenceran

### 5. Tugas pendahuluan:

1. Jelaskan 3 tipe alkaloid: alkaloid sejati, protoalkaloid, dan pseudoalkaloid, dan berikan contoh masing-masing!
2. Jelaskan sifat fisika dan kimia dari senyawa piperin!
3. Gambarkan struktur kimia dari senyawa piperin!
4. Jelaskan prinsip kerja dari KLT-densitometri!
5. Apa perbedaan KLT biasa dengan KLT-densitometri?

## BAB XI ISOLASI PIPERIN

### 1. Tujuan praktikum

Setelah mengikuti praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat melakukan isolasi senyawa alkaloid piperin dari simplisia menggunakan metode sederhana.

### 2. Pendahuluan

Piperin ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ) atau 1-piperoylpiperidine adalah suatu senyawa alkaloid yang dapat ditemukan pada akar dan buah dari famili Piperaceae, seperti cabe jawa dan lada. Piperin memiliki bentuk prisma monosiklik dari alkohol dengan titik lebur  $130^{\circ}C$ , sedikit larut dalam air (40mg/L dalam  $18^{\circ}C$ ), larut dalam alkohol (1g/15ml) dan eter (1g/1.7ml).

### 3. Alat dan bahan

- **Alat:** soxhlet, *rotary evaporator*, oven, Erlenmeyer, gelas ukur, plat KLT silika GF<sub>254</sub>, chamber, kertas saring, lemari pendingin, wadah vial, penangas
- **Bahan:** simplisia buah cabe jawa/lada, etanol 95%, larutan KOH-etanol 10%, n-heksana, etil asetat, standar piperin

### 4. Prosedur kerja

#### a. Isolasi piperin

- Serbuk simplisia ditimbang 10 g, diekstraksi dengan 150 ml etanol 95% menggunakan alat soxhlet selama 2 jam.
- Larutan disaring lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu  $60^{\circ}C$
- Tambahkan 10 ml KOH-etanol 10% dan larutan didekantasi (diendapkan)
- Ekstrak dibiarkan semalam pada suhu ruang hingga terbentuk kristal jarum warna kuning.
- Lakukan proses rekristalisasi dengan penambahan etil asetat sebanyak 1 ml (untuk membantu kelarutannya, dapat dipanaskan dalam penangas).
- Tambahkan n-heksana sampai terbentuk larutan seperti coklat susu.
- Panaskan di penangas hingga terbentuk seperti gom coklat dipermukaan wadah.
- Pisahkan bagian larutkan, lalu diamkan hingga terbentuk kristal.
- Lakukan rekristalisasi lagi jika diperlukan.

**b. Pemeriksaan kualitatif piperin**

Uji coba dengan KLT dengan kondisi berikut:

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

Fase gerak : n-heksana:etil asetat (1:1)

Deteksi : - Sinar UV 254 nm

- Pereaksi semprot Dragendorff

- Pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat lalu dipanaskan pada suhu 40-60°C.

Cek nilai R<sub>f</sub> hasil isolasi dan dibandingkan dengan nilai R<sub>f</sub> pembanding piperin.

**5. Tugas Pendahuluan**

1. Apa yang dimaksud dengan proses isolasi senyawa?
2. Sebutkan pelarut apa saja yang dapat digunakan untuk mengekstraksi piperin!
3. Mengapa pada proses deteksi piperin digunakan pereaksi semprot Dragendorff?

## DAFTAR PUSTAKA

1. Auterhoff, kovar. 1997. Identifikasi obat stas otto gang KLT. Bandung : ITB Bandung
2. Clark. 2005. Isolation and Identification of Drug and Pharmaceutica. Jakarta
3. Depkes RI. 1995. Materi Medika Indonesia, jilid IV. Jakarta
4. Harbone, betram G. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan, edisi II. Bandung : ITB Press
5. Seno, Sastroamijoyo. 1997. Obat Asli Indonesia. Jakarta : Dian Rakyat
6. Farmakope Indonesia VI
7. Adjuwana, Nur M.A. 1989. *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.
8. Harborne J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
9. Paul C. 2002. "The Essence of Chromatography," Elsevier. (e-book, <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780444501981>)
10. Hanani, Endang. 2015. Analisis Fitokimia. Jakarta: EGC.



Pertemuan		
1	Kontrak perkuliahan Teori pembuatan simplisia, ruang lingkup praktek fitokimia	
2	Pembuatan serbuk dan ekstraksi	
3	Uji organoleptis serbuk (warna, bau, rasa) Identifikasi reaksi warna metabolit primer dan sekunder	
4	Evaporasi (isolasi piperin)	
5	Evaporasi (isolasi piperin)	
6	Fraksinasi	
7	Kromatografi kolom	
8	KLT	
9	Penetapan kadar tanin	
10	UTS	
11	UTS	
13	UAS	