



FAKULTAS FARMASI

UAD Kampus 3 Jl. Prof. Dr. Soepomo, SH., Warrungboto, Umbulharjo, Yogyakarta

Halaman Judul
MODUL PRAKTIKUM

FITOKIMIA

PP/FAR/PF/04/8



Penyusun :

Dr. apt. Laela Hayu Nurani, M.Si.

apt. Zainab, M.Si

Dr. rer. nat. apt. Sri Mulyaningsih, M.Si.

Dr. Nanik Sulistyani, M.Si.

LABORATORIUM FARMAKOLOGI FITOKIMIA
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
YOGYAKARTA
2023

DAFTAR ISI

Halaman Judul	I
Daftar Isi	ii
Daftar Lampiran	iii
Daftar Gambar	Iv
Kata Pengantar	V
Tata Tertib Praktikum Fitokimia	6
Panduan Keselamatan Kerja Di Laboratorium	8
Pertemuan 1 (Asistensi)	10
Pertemuan 2 General Test	33
Pertemuan 3 (Pretes P1) Isolasi Dan Identifikasi Minyak Atsiri	34
Pertemuan 2 (Praktikum P1) Isolasi Dan Identifikasi Minyak Atsiri	37
Pertemuan 3 (Pretes P2) Isolasi Dan Identifikasi Etil Para-Metoksi Sinamat	39
Pertemuan 5 (Praktikum P2) Isolasi Dan Identifikasi Etil Para-Metoksi Sinamat	41
Pertemuan 6 (Pretest P3) Isolasi Dan Identifikasi Alkaloid	43
Prinsip Kerja	43
Pertemuan 7 (Praktikum P3) Isolasi Dan Identifikasi Alkaloid	44
Pertemuan 8 (Pretest P4) Isolasi Dan Identifikasi Poliketida	48
Pertemuan 9 (Praktikum P.4) Isolasi Dan Identifikasi Poliketida	52
Pertemuan 10 (Pretest P5) Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid	56
Pertemuan 11 (Praktikum P5) Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid	58
Rentang Serapan Spektra Uv-Vis Dari Flavonoid	61
Pertemuan 13 (Praktikum P6) Identifikasi Struktur Parsial Flavonoid	62
Pertemuan 14 Review	64
Pertemuan 16 (Responsi Praktikum)	65

Daftar Lampiran

Lampiran 1	70
------------	----

Lampiran 2. Format Laporan Praktikum	71
Lampiran 3. Contoh Sampul Depan	72
Lampiran 4. Contoh Halaman Isi Laporan Praktikum untuk P1	73
Lampiran 5. Contoh Halaman Isi Laporan Praktikum untuk P2 s.d P6	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Rangkaian Alat Soxhlet	11
Gambar 2. Proses Ekstraksi Menggunakan Corong Pisah	12
Gambar 3. Melting Point Apparatus SMP-3	13
Gambar 4. Refraktometer	13
Gambar 5. Spektrofotometer	14
Gambar 6. Spektrum UV-Vis flavonoid	15
Gambar 7. Struktur etil-p-metoksisinamat	40
Gambar 8. Skema kerja isolasi alkaloid pipetin dalam buah lada	44
Gambar 9. Senyawa poliketida dalam usnea thalus	49
Gambar 10. Kromatogram lapis tipis ekstrak usnea thalus	50
Gambar 11. Alat Infundasi	58
Gambar 12. Alat spektrofotometer	62

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'amin, segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan ridlo-Nya, sehingga Buku Petunjuk Praktikum Fitokimia ini dapat disusun sesuai dengan capaian pembelajaran lulusan.

Buku petunjuk ini mengalami perubahan dari edisi sebelumnya, yaitu ditambahkan materi dalam bentuk video sehingga mahasiswa lebih mudah menyiapkan kegiatan praktikum. Selain itu, buku petunjuk ini juga memuat gambar-gambar rangkaian alat yang digunakan. Dengan demikian mahasiswa diharapkan akan lebih mengetahui gambaran dalam pemasangan alat-alat yang akan digunakan untuk praktikum. Buku petunjuk ini memuat dasar-dasar ekstraksi, fraksinasi, serta isolasi, dan identifikasi struktur parsial flavonoid. Golongan senyawa yang dilakukan ekstraksi adalah minyak atsiri, alkaloid, poliketida, dan flavonoid. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi, destilasi, penyarian dengan alat Soxhlet, serta decocta.

Kami menyadari sepenuhnya bahwa buku ini masih jauh dari kesempurnaan, terutama dari segi isi dan tata letak. Kritik dan saran terhadap edisi berikutnya sangat kami harapkan.

Yogyakarta, Februari 2023

Tim Penyusun

Laboratorium Farmakognosi Fitokimia
Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

TATA TERTIB PRAKTIKUM FITOKIMIA

Tata tertib bagi mahasiswa yang mengikuti praktikum kimia organik yaitu :

1. Mahasiswa diwajibkan untuk mengikuti rangkaian acara praktikum, yang meliputi: asistensi, general test, pretest, praktikum dan menyusun laporan, serta mengikuti responsi.
2. Petest dilakukan sebelum praktikum. Pada saat petest, mahasiswa diwajibkan untuk membuat laporan sementara dan membawa jawaban dari pertanyaan yang tertera di setiap percobaan.
3. Bagi mahasiswa yang belum pretest, tidak diperkenankan untuk praktikum.
4. Apabila pada saat jadwal pretest mahasiswa tidak dapat hadir, maka dapat meminta pretest kepada asisten dosen masing-masing di hari lain, dengan menunjukkan surat keterangan ijin.
5. Mahasiswa hadir 15 menit sebelum praktikum dimulai, toleransi keterlambatan maksimum 15 menit.
6. Bagi mahasiswa yang berhalangan mengikuti praktikum, dapat inhal di hari lain dengan disertai surat keterangan ijin.
7. Akhir praktikum akan diadakan responsi, dengan persyaratan yaitu mahasiswa mengikuti rangkaian acara praktikum $\pm 75\%$.
8. Apabila praktikum gagal (sintesis tidak berhasil), yang terjadi karena kesalahan praktikan, maka kelompok praktikan tersebut harus inhal di hari lain dan akan dikenakan biaya inhal. Namun apabila kegagalan praktikum karena kondisi tertentu (misalnya karena suatu prasarana yang tidak memadai), maka kelompok praktikan tersebut dapat mengulanginya di hari lain atau ikut kelompok lain dan tidak dihitung sebagai inhal.
9. Laporan resmi dari praktikum terakhir dikumpulkan paling lambat satu minggu setelah praktikum selesai. Apabila mahasiswa mengumpulkan laporan lebih dari ketentuan, maka laporan tidak akan dikoreksi dan dianggap tidak mengumpulkan.

Ketentuan Inhal

Inhal adalah pengganti yang diadakan karena praktikan tidak mengikuti pretes/ praktikum sesuai jadwal yang telah ditentukan. Ketentuan inhal adalah sebagai berikut :

1. Permohonan inhal (pretes/praktikum) dapat diajukan oleh mahasiswa apabila sakit atau ada kegiatan kampus yang dibuktikan dengan surat izin resmi.

2. Mahasiswa yang akan inhal, mengisi form Surat Keterangan Inhal (pretes/praktikum) yang tersedia di laboratorium. Form tersebut ditandatangani oleh Koordinator Praktikum dan melampirkan bukti pendukungnya.
3. Membayar biaya inhal Rp 25.000/mahasiswa sesuai dengan **ketentuan yang berlaku** (inhal praktikum), sedangkan untuk inhal pretes tidak dikenakan biaya.

PANDUAN KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM
INSTRUKSI KERJA KESELAMATAN DAN KESEHATAN KERJA DI LABORATORIUM

- a. Wajib memakai jas laboratorium, alas kaki tertutup, masker, sarung tangan, dan bila diperlukan gunakan google.
- b. Dilarang keras merokok, makan, dan minum didalam ruang lboratorium.
- c. Semua pekerjaan dan penggunaan bahan kimia berbahaya dengan uap beracun atau merangsang pernafasan harus dilakukan didalam lemari asam.
- d. Hati-hati dengan semua pekerjaan pemanasan.
- e. Hindarkan percikan cairan atau terhirupnya uap selama bekerja.
- f. Jauhkan senyawa organik yang mudah menguap dari api secara terbuka. Sebaiknya pemanasan dilakukan menggunakan *waterbath*.
- g. Jangan menghisap pipet dengan mulut, gunakan propipet.
- h. Tutup kembali botol reagen yang yang sudah dipakai.
- i. Bila ada bahan kimia yang tumpah segera lapor pada laboran atau petugas laboratorium.
- j. Bila terjadi kontak dengan bahan kimia berbahaya segera bilas dengan air sebanyak-banyaknya dan lapor kepada petugas laboratorium.
- k. Bila terjadi kontak dengan bahan uji biologis segera bersihkan dengan disinfektan.

INSTRUKSI KERJA PENGGUNAAN BAHAN KIMIA

1. Jangan menghirup uap dan aerosol
2. Hindari kontak langsung dengan bahan kimia
3. Pastikan ventilasi ruang memadai
4. Jangan membuang bahan kimia ke saluran pembuangan sebelum diencerkan
5. Jika terkena bahan kimia tidak panik
6. Mintalah bantuan teman yang ada di dekat anda
7. Jika terhirup: bawalah ke tempat yang cukup oksigen atau udara segar
8. Jika kontak dengan kulit, cuci dengan air yang mengalir dan oleskan PEG 400, lepaskan pakaian yang terkontaminasi. Jangan digaruk supaya tidak menyebar
9. Jika kontak dengan mata, bilaslah dengan air mengalir yang banyak
10. Jika tertelan: beri air minum (kurang lebih 2 gelas), dan diusahakan tidak sampai muntah, sebelum dibawa ke dokter

INSTRUKSI KERJA JIKA TERJADI KEBAKARAN

- a. Jika terjadi kebakaran, jangan panik
- b. Ambillah alat pemadam api ringan apabila api masih mungkin dipadamkan
- c. Hindari menghirup asap
- d. Tutuplah pintu untuk menghindari api membesar dengan cepat (jangan dikunci)
- e. Hubungi pemadam kebakaran DIY terdekat (0274) 587101 dan pertolongan darurat 113.

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

NAMA:

NIM :

Dengan ini saya menyatakan telah membaca dan memahami dengan sebenar-benarnya tata tertib praktikum dan panduan keselamatan kerja di laboratorium.

Yogyakarta,

(.....)

**PERTEMUAN 1
(ASISTENSI)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA**

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan metode isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid dan identifikasi senyawa.

Dasar Teori

Isolasi secara umum diartikan sebagai pemisahan sesuatu dari populasinya atau habitatnya. Hasil isolasi berupa suatu isolat. Isolat bisa merupakan suatu senyawa murni (hanya satu senyawa) maupun senyawa yang belum murni. Isolasi dalam konteks isolasi senyawa bahan alam merupakan pemisahan suatu golongan senyawa maupun senyawa yang terdapat dalam bahan alam baik nabati maupun hewani. Teori terkait teknik isolasi diambil dari petunjuk praktikum Kimia Organik yang dilakukan untuk isolasi senyawa bahan alam.

A. Teknik Ekstraksi

Isolasi merupakan proses pemisahan untuk mendapat suatu isolat atau senyawa murni. Proses isolasi melalui tahapan penyarian, fraksinasi, dan proses isolasi itu sendiri. Isolasi untuk mendapatkan senyawa aktif dengan aktivitas tertentu dapat dilakukan menggunakan metode *bioassay-guided isolation* terhadap aktivitas yang diinginkan. Langkah pertama yang dilakukan adalah dengan menyari senyawa-senyawa menggunakan pelarut yang polaritasnya berbeda. Ekstrak yang diperoleh dengan polaritas yang berbeda tersebut kemudian diuji aktivitasnya. Ekstrak yang paling potensial dilanjutkan dengan fraksinasi dan diuji aktivitasnya kembali. Fraksi yang paling potensial diisolasi dan diuji aktivitasnya kembali serta dilakukan elusidasi struktur senyawanya.

Penyarian adalah kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Faktor yang mempengaruhi kecepatan penyarian adalah kecepatan difusi zat yang larut melalui lapisan-lapisan batas antara cairan penyari dengan bahan yang mengandung zat yang akan disari. Metode penyarian yang biasa digunakan adalah metode infundasi, maserasi, perkolasi, penyarian dengan alat Soxhlet, serta destilasi. Pemilihan metode yang tepat untuk isolasi didasarkan pada stabilitas senyawa yang akan diisolasi. Pelarut yang digunakan untuk penyarian berdasarkan pada polaritas senyawa yang akan diisolasi.

Partisi dilakukan dengan menambahkan pelarut yang tidak campur untuk memisahkan senyawa berdasar polaritas senyawa yang tersari. Proses tersebut dapat dilakukan dengan kromatografi lapis

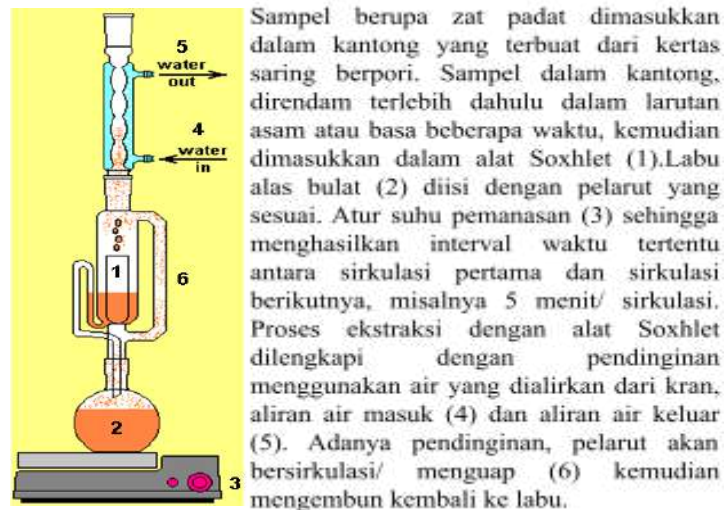
tipis, kromatografi kertas, kromatografi cair kinerja tinggi, dan kromatografi kolom. Fase diam dan fase gerak yang digunakan untuk memisahkan kandungan senyawa tergantung dari polaritas senyawa tersebut.

B. Teknik Isolasi

Isolasi dilakukan dengan tahapan ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi senyawa. Namun demikian, proses isolasi tanpa fraksinasi juga sangat mungkin untuk dilakukan. Sebagai contoh adalah saat dilakukan isolasi senyawa golongan flavonoid dari daun ketela pohon, dilakukan dengan decocta daun ketela pohon, selanjutnya dilakukan penyaringan, yang pada akhirnya hasil penyaringan disimpan dalam almari pendingin sampai terbentuk kristal akibat senyawa flavonoid tidak larut dalam air dingin. Alat yang digunakan sebagai ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi adalah:

1. Ekstraksi dengan Alat Soxhlet

Ekstraksi kontinu dimaksudkan untuk memisahkan senyawa alam yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan atau hewan. Senyawa organik yang terdapat dalam bahan alam seperti kafein dari daun teh dapat diambil dengan cara ekstraksi jangka panjang menggunakan peralatan ekstraksi yang disebut alat Soxhlet. Rangkaian alat Soxhlet dan proses ekstraksinya terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rangkaian Alat Soxhlet

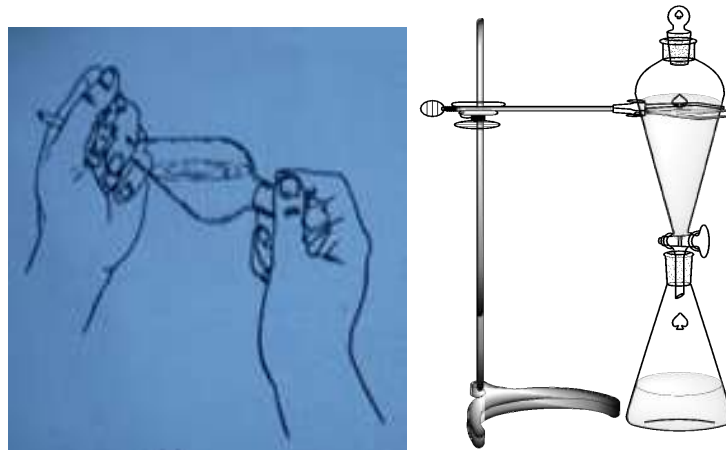
2. Destilasi

Destilasi adalah suatu metode pemisahan campuran yang didasarkan pada perbedaan tingkat volatilitas (kemudahan suatu zat untuk menguap) pada suhu dan tekanan tertentu. Destilasi merupakan proses fisika dan tidak terjadi adanya reaksi kimia selama proses berlangsung.

Prinsip utama pemisahan dengan cara destilasi adalah perbedaan titik didih cairan pada tekanan tertentu. Proses destilasi biasanya melibatkan suatu penguapan campuran dan diikuti dengan proses pendinginan dan pengembunan. Sebagai contoh, suatu campuran yang di dalamnya terdapat dua zat, yaitu zat A dan zat B. Zat A mempunyai titik didih sekitar 120°C , sedangkan zat B mempunyai titik didih sebesar 80°C . Zat A dapat dipisahkan dari zat B dengan cara mendestilasi campuran tersebut pada suhu sekitar 80°C . Pada suhu tersebut, zat B akan menguap sedangkan zat A tetap tinggal. Secara sederhana.

3. Fraksinasi

Teknik fraksinasi dapat dilakukan dengan metode cair-cair dengan ini merupakan cara yang paling sederhana. Senyawa cair yang akan diekstraksi dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan ke dalamnya pelarut secukupnya. Dikocok kuat-kuat untuk memudahkan menarik senyawa tersebut dari pelarut semula, kemudian didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Selanjutnya, kedua lapisan tersebut dipisahkan dengan membuka kran corong pisah. Proses fraksinasi menggunakan corong pisah dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Proses Ekstraksi Menggunakan Corong Pisah

2. Identifikasi Hasil Isolasi

Identifikasi senyawa hasil isolasi merupakan langkah yang penting dilakukan setelah proses isolasi selesai. Identifikasi adalah suatu tahap untuk mengetahui kebenaran senyawa yang diisolasi. Identifikasi senyawa hasil isolasi dalam praktikum fitokimia ini meliputi penentuan titik lebur, indeks bias, dan pola puncak spektrumnya secara spektrofotometri dengan alat spektrofotometer ultra violet–visibel.

1. Titik lebur

Titik lebur (*melting point*) suatu zat bentuk kristal adalah temperatur pada saat zat padat mulai berubah menjadi cairan di bawah tekanan satu atmosfer. Titik lebur dapat digunakan sebagai identifikasi suatu senyawa secara kualitatif. Sebagai contoh, kurkumin mempunyai titik lebur 177–178°C (Pabon, 1964). Apabila sintesis kurkumin, kebenaran produk sintesis dapat dibuktikan dari kisaran titik lebur teori tersebut.

Selain itu, titik lebur dapat juga digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa, baik hasil sintesis maupun isolat senyawa alam. Adanya kotoran yang larut atau sebagian larut akan menyebabkan turunnya titik lebur dari bahan murni. Kotoran yang tidak larut juga akan menyebabkan peleburan yang tidak nyata, rentang jarak lebur menjadi lebih panjang (Reksohadiprojjo, 1996). Alat penentu titik lebur terlihat pada Gambar 3.



Hubungkan alat dengan sumber listrik (1), tekan tombol ON (2), lampu akan menyala. Tekan tombol MODE (3), atur suhu 10°C di atas suhu titik lebur teori dan SLOPE dengan menekan tombol panah atas. Suhu dan gradien yang telah diatur dapat dilihat pada layar (4). Masukkan zat uji ke dalam pipa kapiler, kemudian masukkan pada lubang alat (5). Tekan tombol START pada alat (2). Amati sampel melalui lensa (6).

Gambar 3. Melting Point Apparatus SMP-3

2. Indeks bias

Indeks bias adalah perbandingan kecepatan cahaya dalam vacuum terhadap kecepatan dalam bahan. Alat pengukur indeks bias dinamakan refraktometer (Gambar 4). Pengukuran indeks bias dimaksudkan untuk identifikasi senyawa kimia dan menentukan kemurniannya. Adanya kotoran akan mempengaruhi harga n . Sebagai contoh, benzen ($n_D^{20} = 1,5010$), dalam keadaan campuran apabila diukur menjadi $n_D^{20} = 1,5108$. Selain itu, indeks bias dapat juga digunakan untuk menentukan konsentrasi dari suatu larutan.

Indeks bias dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$\frac{N}{n} = \frac{\sin i}{\sin r} = \frac{\sin 90^\circ}{\sin r} = \frac{1}{\sin r}$$

Dengan $g =$ terukur, N diketahui (gelas flint $N = 1,75$) dan n dapat ditemukan (Reksohadiprodjo, 1996).



Hubungkan alat dengan sumber listrik (1). Tekan tombol ON. Atur suhu pada alat (2). Buka penutup kompartemen (3), teteskan aquadest pada kompartemen, bersihkan dengan tisu. Teteskan zat uji pada bidang kompartemen. Lihat melalui lensa hingga terlihat warna merah kuning (4). Atur tombol ulir pada lensa (5) hingga terlihat fase kontras antara warna merah kuning dengan warna gelap, sehingga tanda silang memotong fase kontras tersebut. Baca indeks bias pada skala yang ada di bawah fase kontras no 8.

Gambar 4. Refraktometer

3. Spektrum Ultra Violet–Visibel

Prinsip dari spektrofotometri ultra violet–visibel (UV–Vis) yaitu bahwa alat tersebut memancarkan radiasi elektromagnetik. Apabila cahaya jatuh pada senyawa, maka sebagian dari cahaya diserap oleh molekul–molekul sesuai dengan struktur molekul tersebut. Setiap senyawa mempunyai tingkatan tenaga yang spesifik. Apabila cahaya mempunyai tenaga yang sama dengan perbedaan tenaga antara tingkatan dasar dan tenaga tingkatan tereksitasi jatuh pada senyawa, maka elektron–elektron pada tingkatan dasar dieksitasikan ke tingkatan tereksitasi. Sebagian tenaga cahaya yang sesuai dengan panjang gelombang ini diserap. Elektron yang tereksitasikan melepaskan tenaga dengan proses radiasi panas dan kembali ke tingkatan dasar. Oleh karena perbedaan tenaga antara tingkat dasar dan tingkat tereksitasi spesifik untuk tiap–tiap senyawa, maka frekuensi yang diserap juga tertentu. Gambar hubungan intensitas radiasi (absorbansi) sebagai fungsi panjang gelombang (frekuensi) dikenal dengan spektrum serapan (Sastrohamidjojo, 1991^a). Rangkaian alat spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 5.

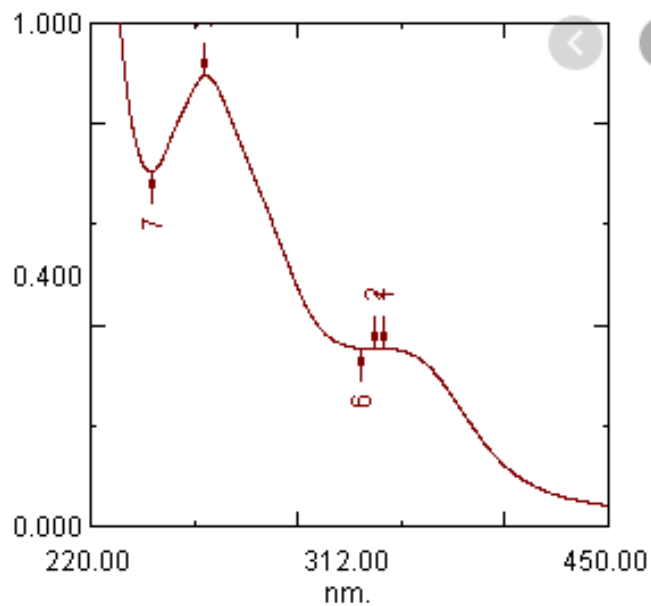
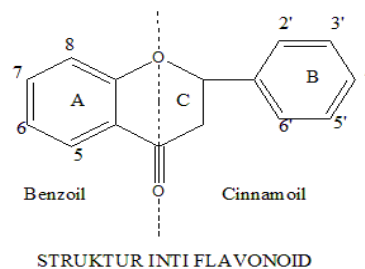


Keterangan :

- Tempat sampel
- Tombol-tombol pengaturan
- Layar spektrofotometer

Gambar 5. Spektrofotometer

Spektrum dari senyawa yang diukur dengan spektrofotometer Ultra Violet–Visibel merupakan salah satu metode spektroskopi yang digunakan untuk identifikasi suatu senyawa secara kualitatif, baik hasil sintesis maupun senyawa alam. Setiap senyawa yang strukturnya berbeda akan memberikan pola puncak spektrum dan panjang gelombang maksimum yang berbeda pula. Sebagai contoh, spektrum senyawa golongan flavonoid seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Spektrum UV–Vis flavonoid

4. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikakimia. Metode ini dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa, baik senyawa hasil isolasi dari bahan alam maupun sintesis. Selain itu, metode ini juga dapat digunakan untuk identifikasi senyawa hasil sintesis dengan membandingkannya dengan bahan awal. Beberapa kondisi baku dalam kromatografi lapis tipis ini dapat berpengaruh terhadap kromatogramnya, antara lain: fase diam, fase gerak, penempatan cuplikan, penjenjuran, pengembangan dan lokasi.

Fase diam KLT berupa lapisan tipis yang tebalnya 0,1–0,3 mm. Lapisan tersebut berfungsi sebagai penyerap. Penyerap yang umum ialah silika gel, aluminium oksida, kieselgur, selulosa dan poliamida. Silika gel merupakan penyerap yang paling banyak digunakan. Penyerap tersebut dibentangkan di atas *plate* kaca atau aluminium dengan ukuran 20 x 20 cm. *Plate* yang sudah berisi lapisan penyerap tersebut sebelum digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan di oven pada suhu 100°C selama 30 menit.

Fase gerak dalam KLT merupakan medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut yang bergerak di dalam fase diam karena adanya daya kapiler. Sebaiknya dipilih campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin, karena hal ini akan mengurangi serapan dari setiap komponen campuran pelarut. Apabila komponen campuran pelarut mempunyai sifat polar tinggi, maka akan mengubah sistem menjadi partisi. Campuran pelarut sedapat mungkin terdiri dari dua komponen. Campuran pelarut yang lebih kompleks cepat mengalami perubahan fasa terhadap perubahan suhu. Pengisian fase gerak dalam *chamber* biasanya 0,5–0,8 cm dan *chamber* tersebut harus tertutup rapat.

Sampel ditempatkan pada lapisan tipis dengan cara ditotolkan di atas *plate* 1 cm dari ujung yang nantinya dicelupkan dalam pelarut. Penempatan sampel satu dengan lainnya diberi jarak 1 cm. Larutan cuplikan ditotolkan 1–10 μL dengan konsentrasi 0,1–1 %. Penotolan sampel sebaiknya menggunakan mikropipet berujung runcing yang berskala 1 μL dan bervolume 10 μL . Larutan yang jumlahnya besar ditotolkan sedikit demi sedikit dan dibiarkan menguap sebelum penotolan berikutnya. Untuk garis awal, diberi tanda pada ujung *plate* dengan pensil dan akhir garis dibuat di bagian atas dengan menggoreskan pensil sehingga aliran pelarut dapat ditahan apabila permukaan pelarut sampai pada garis tersebut.

Plat kromatografi yang telah ditotolkan sampel dikeringkan di udara selama 5-10 menit. Plat dielusi dalam bejana dengan dicelupkan dalam fase gerak yang sesuai. Jarak elusi normal ialah 10 cm, yang merupakan jarak antara garis awal dengan garis akhir. Dinding dalam bejana dapat dilapisi kertas

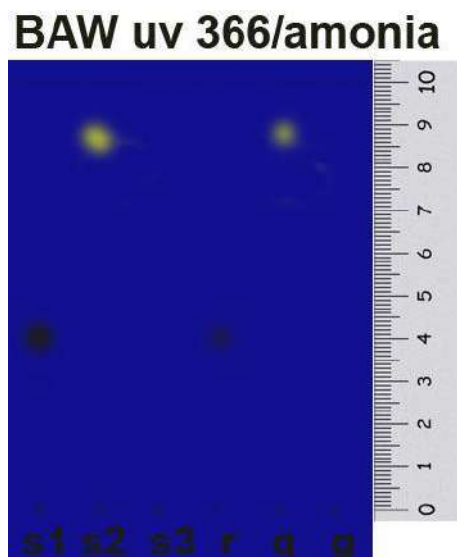
saring yang ujungnya direndam dalam fase gerak, dengan tujuan untuk meyakinkan homogenitas dari atmosfer dalam bejana. Apabila tanpa kertas saring, laju aliran pelarut pengembang dapat lebih cepat di dalam bejana, untuk jarak pengembangan yang sama.

Plat yang telah dikembangkan dibiarkan kering di udara dan bercak diidentifikasi dengan cara fisika dan kimia. Metode fisika yang paling sederhana ialah fluoresensi sinar ultraviolet (UV). Suatu indikator fluoresensi (F_{254}) perlu ditambahkan pada penyerap, sehingga senyawa pada plat dapat dideteksi, yang menghasilkan fluoresensi kuat di daerah UV pada panjang gelombang 254 nm. Senyawa yang akan dideteksi tampak sebagai bercak (spot) gelap pada latar belakang yang berfluoresensi kuning-hijau. Identifikasi spot secara kimia digunakan penyemprotan menggunakan reagen. Pereaksi kimia yang biasa digunakan ialah asam sulfat, uap Iod, anisaldehyd, kalium permanganat, larutan ninhidrin atau pereaksi lain berdasarkan senyawa dalam sampel yang akan diidentifikasi (Sthal, 1985; Sastrohamidjojo, 1991^b).

Hasil KLT berupa spot dihitung nilai Rf (*retention factor*). Nilai Rf diperhitungkan sebagai perbandingan relatif antar sampel. Nilai Rf juga menyatakan derajat retensi suatu komponen dalam fase diam, sehingga sering disebut dengan faktor retensi. Nilai Rf dapat dihitung dengan rumus berikut ini.

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut (cm)}}$$

Semakin besar nilai Rf dari sampel, maka semakin besar jarak Bergeraknya senyawa pada plat KLT. Pada waktu membandingkan dua sampel yang berbeda di bawah kondisi kromatografi yang sama, nilai Rf akan besar apabila senyawa tersebut kurang polar dan berinteraksi dengan penyerap polar dari KLT. Contoh hasil KLT isolasi dan identifikasi flavonoid pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Kromatografi kertas

PPT Asistensi

Asistensi Praktikum Fitokimia

Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia

Kompetensi

Mahasiswa dapat menjelaskan dan dapat melakukan:

- Isolasi dan identifikasi minyak atsiri.
- Isolasi dan identifikasi alkaloid
- Isolasi dan identifikasi poliketida
- Isolasi dan identifikasi flavonoid



Tata Tertib

- Semua melakukan protokol covid 19
- Praktikum dimulai pada jam 13.00 WIB
- Pretest dimulai jam 13.15 WIB secara on line.
- Praktikan memakai jas lab
- Perwakilan kelompok melakukan persiapan alat sebelum jam 13.00
- Tidak membuat kegaduhan dan bersikap hati-hati
- Melaksanakan sesuai dengan cara kerja
- Menyerahkan hasil praktikum berupa kristal ke laboratorium

Perc	Materi	Metode separasi (ekstraksi, fraksinasi, isolasi)	Parameter kemurnian Indeks bias	Metode Identifikasi GC-MS (standar sitronelol) KLT (standar EPMS)
P1	Isolasi dan identifikasi minyak atsiri serai	Destilasi uap dengan alat destilasi STAHL		
P2	Isolasi dan identifikasi minyak atsiri rimpang kencur	Maserasi dengan pelarut etanol 96%	Titik lebur	KLT (standar piperin)
P3	Isolasi dan identifikasi alkaloida biji merica	Maserasi dengan pelarut etanol 96%	Titik lebur	KLT (standar asam usnat)
P4	Isolasi dan identifikasi poliketida Usnea thaluss	Ekstraksi dengan alat soxhlet dan pelarut acetone	Titik lebur	KLT (standar rutin, quersetin, glukosa dan rhamnosa)
P5	Isolasi dan identifikasi flavonoid daun ketela pohon	Ekstraksi glikosida flavonoid dengan metode dekokta.	Titik lebur	Spektro Fotometri Standar quersetin
P6	Identifikasi struktur parsial glikosida flavonoid	-	-	-

Tiap kelompok melaksanakan pretes dengan materi yang sama

JADWAL PRETES

Kelp.	Minggu ke					
	1	2	3	4	5	6
1	P1	P2	P3	P4	P5	P6
2	P1	P2	P3	P4	P5	P6
3	P1	P2	P3	P4	P5	P6
4	P1	P2	P3	P4	P5	P6
5	P1	P2	P3	P4	P5	P6
6	P1	P2	P3	P4	P5	P6

JADWAL PRAKTIKUM

Minggu ke	GOLONGAN I ATAU III Asistensi	
1	Distilasi minyak atsiri dan KLT minyak atsiri (P1)	Maserasi Kencur (P2)
2	Isolasi piperin : soxhlet, penguapan, kristalisasi (P3)	penyaringan & evaporasi maserat (lanjutan P2)
3	penyaringan, pengeringan penimbangan isolat piperin, KLT	penyaringan kristal EPMS & KLT EPMS
4	Flavonoid: Infundasi, penyaringan (P5)	Isolasi asam usnat (P4), sintesis asam quersetin
5	penyaringan, pengeringan, hidrolisis rutin	penyaringan, pengeringan & KLT asam usnat
6	kromatografi kertas flavonoid	identifikasi struktur parsial (P6)
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		Review
15		
16		Responsi

P Mulai percobaan

P Melanjutkan percobaan.

P Minggu ke 0 PS (pembuatan simplisia) dilakukan di kost atau di rumah untuk semua simplisia yang digunakan.

Pendalaman Materi (Pretest)

- Dilakukan tanya jawab bersama dosen pembimbing
- Diberikan penilaian
- Wajib mengisi lembar kerja mahasiswa (bagi mahasiswa yang belum mengisi LKM, tidak diperkenankan mengikuti pretes)

	Nama latin
Tanaman	
Kandungan senyawa	Nama Senyawa (rumus molekul & berat molekul)
Distribusi	Kemotaksonomi (tingkat famili)

PERCOBAAN 1

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MINYAK ATSIRI SEREH

Kompetensi:

- Mahasiswa dapat melakukan isolasi komponen mudah menguap dari kulit buah jeruk purut dengan menggunakan ALAT DESTILASI STAHL
- Mahasiswa dapat melakukan identifikasi komponen mudah menguap dari kulit buah jeruk purut dengan menggunakan GC-MS.

Proses

- Isolasi → Destilasi
 - Berdasar sifat fisika kimia zat
- Identifikasi → GC MS
 - BM zat yang diperoleh dibandingkan dengan literatur
- Kemurnian Indeks bias
 - Hasilnya dibandingkan dengan literatur



PERCOBAAN 2

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ETIL PARA METOKSI SINAMAT DARI RIMPANG KENCUR

Kompetensi:

- Mahasiswa mampu melakukan isolasi dan identifikasi etil para metoksi sinamat dari rimpang kencur.

Proses

- Ekstraksi
 - Maserasi → dilakukan remaserasi
- Identifikasi
 - KLT >>> Fase diam: Silika gel G Fase gerak: toluen
- Kemurnian
 - Titik didih dibandingkan dengan referensi

Dilakukan berdasarkan sifat fisika kimia zat

Dengan pembanding EPMS

Dibandingkan dengan referensi

PERCOBAAN 3

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ALKALOID DARI BIJI MERICA

Tujuan Praktikum:

- Mahasiswa mampu melakukan isolasi dan identifikasi piperin dari biji merica.

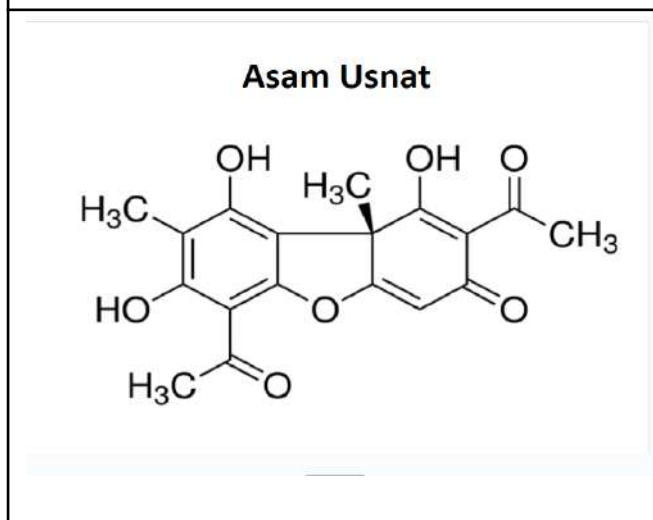
Proses

- Ekstraksi
- Metode dipilih berdasar sifat fisika kimia nya
- Secara maserasi
- Dilakukan remaserasi
- Identifikasi
- KLT
- Digunakan perbandingan piperin
- Disemprot dengan pereaksi identifikasi
- Kemurnian
- Titik dididil kelatol rendemen

PERCOBAAN 4

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ASAM USNAT DARI USNEA Sp

- Kompetensi
 - Mahasiswa memahami tentang pengertian poliketida penggolongan dan tata nama nya serta sifat fisikokimia dan teknik ekstraksinya.
 - Mahasiswa dapat menentukan cara identifikasi poliketida



Proses

- Ekstraksi
 - Dengan Alat soxhlet
 - Penyari aseton
- Identifikasi
 - KLT
- Kemurnian
 - Titik lebur kristalnya

	Heksa na	PE	Benzen	Toluen	CHCl3	DCM	Ester	EtOAc	EtOH	Air panas
Lemak										
Steroid										
Antakinon										
Kumarin										
Flav.poli-CH3										
Resin&Klorofil										
Isoflavon										
Alkaloid bebas										
Kurkumin										
Fenol										
Flav.poli-OH										
Flav.mono.glik										
Glik.antrakinon										
Glik.steroid										
Glik.kumarin										
Glik.Flavonoid										
Tanin										
Saponin										
Gm. Alkaloid										
Karbohidrat										

PEMBUATAN SERBUK (Pekan ke-1)

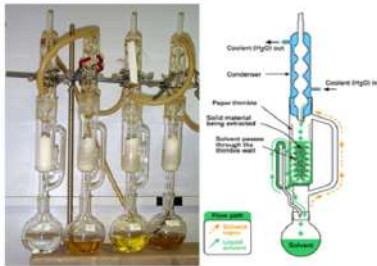
Daun segar

Serbuk daun kering

Dikeringkan di bawah sinar matahari, ditutup kain hitam, jk sudah diperoleh kering, maka langsung diserbuk

Diserbuk, dihancurkan dengan digunting-gunting, dihancurkan dengan stamper, diayak

ALAT SOXHLET



Continuous hot extraction technique
(Soxhlet extraction process)

PERCOBAAN 5

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GLIKOSIDA FLAVONOID
DARI DAUN KETELA POHON

Kompetensi

- Mahasiswa mampu melakukan teknik ekstraksi terhadap simplisia yang mengandung senyawa flavonoid.
- Mahasiswa mampu melakukan identifikasi flavonoid

Proses

- Ekstraksi
- Infundasi
- Kristal
- hidrolisis
- glikon
- aglikon
- Kemurnian
- KLT 2 dimensi
- Identifikasi
- KLT
- Pereaksi khusus

PERCOBAAN 6

IDENTIFIKASI STRUKTUR PARSIAL GLIKOSIDA
FLAVONOID

Tujuan praktikum:

- Mahasiswa dapat melakukan identifikasi struktur parsial flavonoid
- Mahasiswa dapat menerapkan teori dalam elusidasi struktur parsial flavonoid

- ditambahkan 3 tetes pereaksi NaOH 2M
- ditambah 5 tetes pereaksi $AlCl_3$
- ditambah 6 tetes pereaksi $AlCl_3$
- ditambahkan serbuk CH_3COONa
- isolat flavonoid dan CH_3COONa ditambahkan H_2BO_3

Isolasi dan Identifikasi Minyak Atsiri Serai

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MINYAK ATSIRI SERAI

Tujuan:

Setelah mengikuti praktikum ini, Mahasiswa dapat melakukan:

1. Isolasi minyak atsiri dengan destilasi Stahl
2. Identifikasi minyak atsiri dengan KLT

Sifat Minyak Atsiri

1. Bau aromatis
2. Volatil / mudah menguap
3. Dapat tertarik oleh uap air tetapi tidak larut dalam air
4. Larut alkohol, eter, pelarut organik dan minyak lemak
5. Indeks bias tinggi
6. Bersifat optis aktif

Komponen Minyak Atsiri

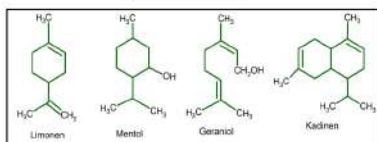
Minyak atsiri terdiri dari dua golongan besar yaitu:

- ▶ terpenoid : tersusun dari unit isopren
- ▶ fenil propan: cincin fenil C₆ yang dilekati rantai samping C₃, C₂, C₁

Golongan terpenoid penyusun minyak atsiri:

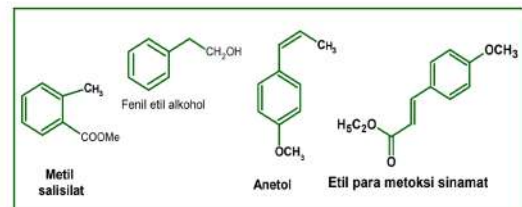
- ▶ monoterpen
- ▶ seskiterpen

TERPENOID



Fenil propanoid

Cincin fenil C₆ yang dilekati rantai samping C₃, C₂, C₁

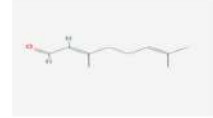


METODE ISOLASI M. ATSIRI

1. Destilasi : air, air & uap, uap langsung
2. Pengepresan
3. Ekstraksi : maserasi, perkolasi dll
4. Enflurasi



KOMPONEN UTAMA:



CITRAL

Isolasi Minyak Atsiri dari Sereh Secara destilasi Stahl



- ▶ Masukkan ke dlm labu destilasi 50 g sereh yang sudah dipotong-potong.
- ▶ Tambahkan air 1/3 sampai 1/2 labu destilasi hingga bahan terendam.
- ▶ Pasang labu destilasi pada alat destilasi Stahl.
- ▶ Lakukan destilasi sampai diperoleh minyak atsiri, 4-6 jam.
- ▶ Baca volume minyak atsiri pada skala penampung.
- ▶ Pisahkan minyak atsiri dan simpan di botol gelap.

Rendemen Minyak Atsiri

$$\text{▶ } \frac{\text{minyak yang diperoleh}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \text{ v/b}$$

Analisis Kimia minyak atsiri dengan KLT

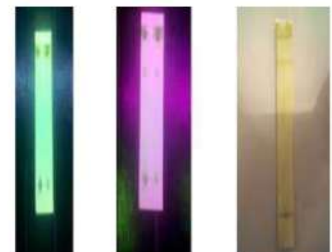
- ▶ Fase diam: silika gel GF 254
- ▶ Fase gerak: heksana : etilasetat (8:2)
- ▶ Penampak bercak: anisaldehyd asam sulfat



Cara kerja KLT



Sampel ditotalkan pada pelat silika

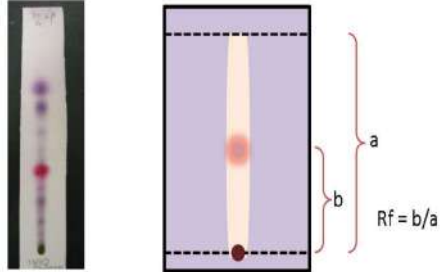


Diamati di bawah uv254, uv 366, pereaksi semprot

Dikembangkan dengan fase gerak

Hitung Rf

Misal hitung Rf pada bercak merah di gambar



Isolasi dan Identifikasi Etil Para Metoksi Sinamat dari Rimpang Kencur

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ETIL PARA METOKSI SINAMAT DARI RIMPANG KENCUR

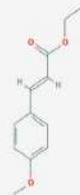
Tujuan:

Setelah mengikuti praktikum ini, Mahasiswa dapat melakukan:

1. Ekstraksi EPMS dengan maserasi
2. Identifikasi EPMS secara KLT

Etil Para Metoksi Sinamat

- Komponen utama rimpang kencur
- Titik leleh 49-50 C
- Mudah larut dalam heksan, etanol, kloroform
- Tidak larut dalam air



Bahan & Alat

- Bahan:
 - 100 g serbuk kasar rimpang kencur
 - etanol 95%
- Alat:
 - Botol bertutup
 - perangkat KLT

Persiapan simplisia



Proses Maserasi

- Masukkan 100 g serbuk kencur dalam labu/botol, tambah 200 ml etanol 95%
- Sesekali digojog
- Setelah 1 minggu disaring
- Filtrat disimpan
- Remaserasi (ampas ditambah etanol)
- Sesekali digojog



Pemekatan dan Kristalisasi

Saring maserat → uapkan dengan evaporator dan masukkan dalam labu → kristalisasi



Penyaringan Kristal dan Rendemen

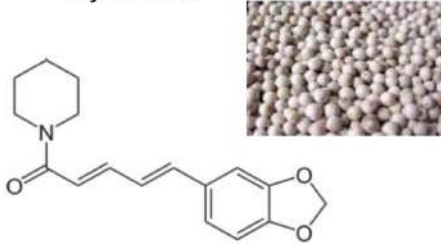
- Kristal disaring dalam kertas saring yang sudah ditara
- Keringkan kristal dalam lemari asam
- Timbang kristal
- Hitung rendemen

Identifikasi EPMS dengan KLT

- Identifikasi dengan KLT
- Fs: silika gel G
- Fm: toluen
- Deteksi : anisaldehyd asam sulfat

Isolasi dan Identifikasi Alkaloid**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ALKALOID**

SAMPEL:
Biji Merica

**ISOLASI ALKALOID DARI MERICA DAN KECUBUNG**

Tujuan:

Mahasiswa mampu melakukan:

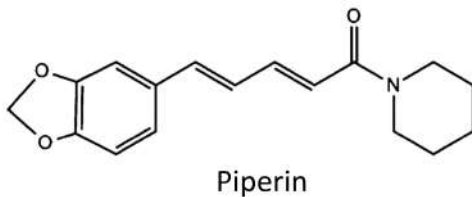
1. Ekstraksi, Fraksinasi, dan Isolasi Alkaloid.
2. Identifikasi golongan alkaloid dengan KLT

Yang harus dipahami terlebih dahulu:

Struktur, golongan, sifat fisikokimia (polaritas dan stabilitas).

Latihan:

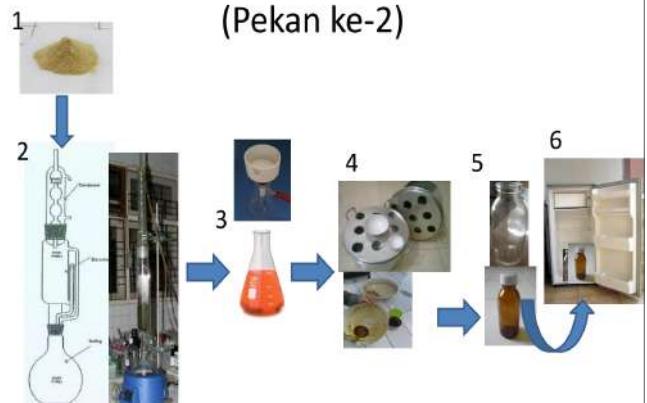
1. Bagaimana polaritas alkaloid di bawah ini?
2. Pelarut apa yg Sdr gunakan untuk menyari alkaloid di bawah ini.
3. Bagaimana stabilitas piperin?

**Alat dan Bahan****BAHAN**

- Serbuk biji merica
- Etanol 96% (teknik)
- KOH-etanolik 10 %
- Silica gel F 254
- Benzene
- Etil asetat
- Pereaksi semprot Dragendorff

ALAT

- Tabung maserasi
- Batang pengaduk
- Cawan porselin
- Corong
- Perangkat KLT
- Glass wool

PEMBUATAN SERBUK (Pekan ke-1)**Ekstraksi dengan Soxhlet (Pekan ke-2)**

Pekan ke-3: Filtrasi untuk memperoleh alkaloid



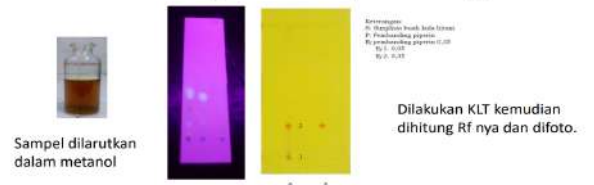
Pekan ke-3 Identifikasi alkaloid

Fase Diam : Silika gel F254

Fase Gerak: Toluena : Etilasetat (7:3)

Pembanding : piperin standar

Deteksi : UV 254, UV 366nm, vis + Dragendorff



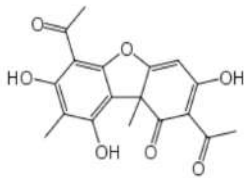
Daftar Pustaka

1. Vasavirama, K., & Upender, M., 2014, Piperine: A Valuable Alkaloid from Piper Species, *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 6, Issue 4, 34-38.
2. Gorgani L. et.al, 2017, Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.16, 2017.
3. Tiwari, A., et.al, 2020, Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties, *Medicine in Drug Discovery*
4. Link you tube : <https://www.youtube.com/watch?v=1hCAY-NU1Qo> dengan judul : Extraction of piperine from white pepper

Isolasi Senyawa Poliketida**ISOLASI SENYAWA POLIKETIDA**

Sampel:

1. Usnea thallus

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI POLIKETIDA**

Tujuan:

Mahasiswa mampu melakukan:

1. Isolasi asam usnat (poliketida)
2. Identifikasi poliketida dengan KLT

Yang harus dipahami terlebih dahulu:

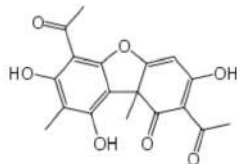
Struktur, golongan, tata nama dan sifat

fisikokimianya (polaritas, kelarutan, stabilitas).

Latihan:

1. Bagaimana polaritas poliketida di bawah ini.
2. Pelarut apa yg Sdr gunakan untuk menyari poliketida di bawah ini.

Asam Usnat

**Alat dan Bahan**

Bahan	Alat
<ul style="list-style-type: none"> • Serbuk kasar Usnea sp (yang berwarna kekuningan) • Aseton teknik. • Heksana Pa • Kloroform pa • Aseton pa • Aquades dingin • Etil asetat pa • Asam asetat glasial • Etil asetat pa • Lempeng KLT silika gel GF 254 	<ul style="list-style-type: none"> • Perangkat alat Soxhlet • Gelas ukur 100 ml • Corong gelas • Cawan Petri • Erlenmeyer 100 ml, • Bejana Kromatografi • Alat pengukur titik lebur

**Prosedur Kerja,
Poliketida Asam Usnat dari Usnea thallus**

- Pekan ke-1
Menyiapkan serbuk usnea dan menimbang.
- Pekan ke-2
Melakukan penyarian dengan alat Soxhlet, menyaring, memekatkan, menyimpan di kulkas
- Pekan ke-3
Menyaring kristal, mengeringkan kristal, menghitung randemen, identifikasi dengan KLT

**PEMBUATAN SERBUK
(Pekan ke-1)**



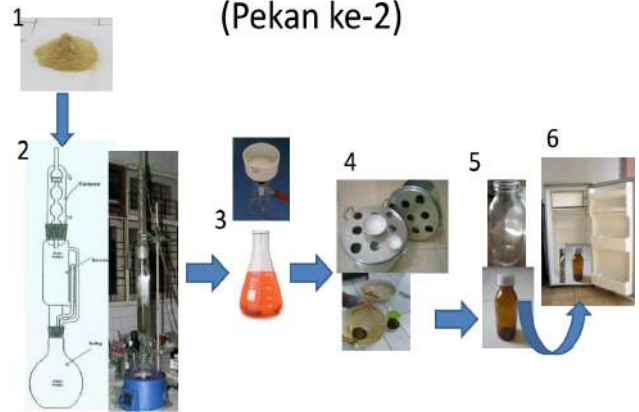
**Pekan ke-2
Ekstraksi dengan alat Soxhlet.**

Lakukan penyarian dengan alat Soxhlet.

**Pekan ke-3
Lakukan KLT**

Fase gerak dan fase diam yang digunakan sesuai buku petunjuk

**Ekstraksi dengan Soxhlet
(Pekan ke-2)**



**Pekan ke-3:
Filtrasi untuk memperoleh asam usnat**

- Timbang kertas saring
- Gunakan kertas saring yang sudah ditimbang untuk melapisi corong buchner. Lakukan filtrasi
- Keringkan di dalam oven

**Pekan ke-3
Identifikasi asam usnat**

- Fase Diam : Silika gel F254
- Fase Gerak: Heksana:etil asetat:asam asetat = 4 : 1 : 1
- Pembanding : Kristal asam usnat standar
- Deteksi : UV 254, UV 366nm, vis + FeCl3

- Sampel dilarutkan dalam metanol
- Dilakukan KLT kemudian dihitung Rf nya dan difoto.

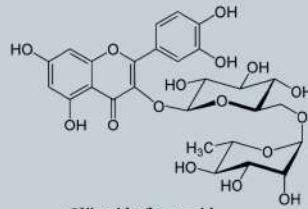
DAFTAR PUSTAKA

- Cansaran D, Kahya D, Yurdakulol E, Atakol O., 2006, Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. *Z Naturforsch C.* ;61:773-776.
- Maulidiyah et.al, 2015, Isolasi dan Identifikasi Senyawa (-)-Asam Usnat dari Lichen *Usnea* sp. serta Aktivitas Sitotoksiknya terhadap Sel Murine Leukemia P388, *JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA*, hlm. 40-44 Vol. 13, No. 1 ISSN 1693-1831
- Link youtube : <https://www.youtube.com/watch?v=Y7uyQl7pzyY> dg judul : Usnic Acid Extraction From *Usnea* Lichen

Isolasi dan Identifikasi Flavonoid

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI
FLAVONOID

Daun Ketela pohon

Glikosida flavonoid
= rutinP5 dan P6: ISOLASI DAN ELUSIDASI
STRUKTUR PARSIAL FLAVONOID

Tujuan:

Mahasiswa mampu melakukan:

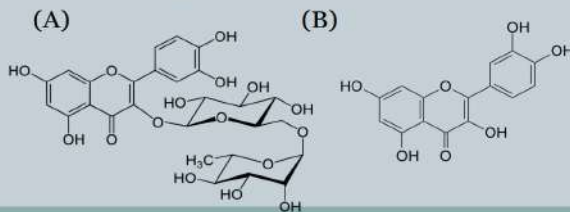
1. Isolasi dan hidrolisis flavonoid (P5)
2. Identifikasi struktur parsial flavonoid (p6)

Yang harus dipahami terlebih dahulu:

Struktur, golongan, tata nama dan sifat fisikokimianya.

Pendahuluan

1. Berilah penamaan flavonoid di bawah ini.
2. Bagaimana polaritas flavonoid di bawah ini.
3. Pelarut apa yg Sdr gunakan untuk menyari flavonoid di bawah ini.



Alat dan Bahan

Alat:

panci infusa, kompor, corong gelas, penangas, cawan porselin, corong pisah, seperangkat alat KLT, spektrofotometer UV-Vis

Bahan :

Daun ketela pohon, aquadest, butanol, asam asetat, pereaksi geser untuk identifikasi flavonoid

P5. Isolasi Flavonoid dari daun ketela pohon

Alur kerja seperti gambar di slide berikutnya:

Cara Kerja

► Isolasi rutin dari daun ketela pohon (Infudasi)

Masukkan 50 gr serbuk daun ketela pohon + aquadest 500ml dan didihkan selama 15 menit

penyaringan

Masukkan air panas 500ml

Filtrat yang diperoleh → disimpan di kulkas selama 1 minggu

- Rutin di timbang dan dihitung rendemennya
- Rutin siap dilakukan hidrolisis

Sebagian rutin dilarutkan metanol air sebagai sari I

Penyaringan filtrat yang mengandung rutin dengan kertas saring yang sudah d timbang

Kertas sarin yg terdapat senyawa rut dikeringkan (Oven)

Pembahasan setelah infundasi

1. Senyawa apa yang Sdr sari dari daun ketela pohon?
2. Mengapa melakukan penyarian dengan air panas dengan metode infundasi?
3. Mengapa senyawa rutin dapat diperoleh setelah dimasukkan dalam almari es?
4. Bagaimana struktur senyawa rutin?

Hidrolisis

1. Ambil sebagian sari I, masukkan dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan HCl 1 N sama banyak. Tutup dengan corong yang ditutup kapas basah untuk mengurangi penguapan.
3. Panaskan di atas penangas selama 1 jam.
4. Dinginkan, pindahkan ke dalam corong pisah.
5. Tambahkan eter, gojog.
6. Diperoleh sari eter (Sari II)
7. Diperoleh sari air asam (Sari III)

Pembahasan setelah dilakukan hidrolisis

1. Apa yang dimaksud dengan hidrolisis?
2. Gambarkan proses hidrolisis rutin menjadi senyawa kuersetin dan gulanya!

A. Identifikasi hasil hidrolisis

Lakukan KLT untuk identifikasi

Fase diam: Kertas Whatman (dua buah kertas yang diberi totalan sampel dan pembanding yang siap dielusi)

Fase gerak:

1. BAW = 4:1:5, fase atas
2. Asam asetat 15 %

B. Uji kemurnian glikosida (Sari I)

Lakukan KLT dua dimensi.

Fase gerak I: asam asetat 15%

Fase gerak II: BAW

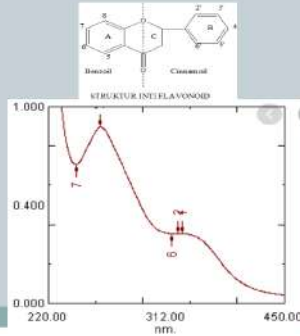
Diskusi setelah identifikasi dengan KLT

1. Fase gerak yang Sdr gunakan apa? Mengapa?
2. Detektor untuk flavonoid untuk membentuk garam apa?
3. Detektor senyawa gula dalam KLT apa?

P6. PENENTUAN STRUKTUR PARSIAL FLAVONOID

P 6. Penentuan struktur parsial flavonoid

Instrumen:
Spektrofotometer
Konsep:
Pita I dan Pita II flavonoid



Cara Kerja:

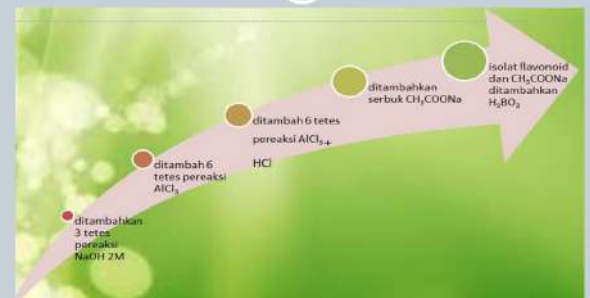
1. Masukkan serbuk / kristal rutin ke dalam flakon, larutkan dalam metanol air sebagai larutan uji.
2. Baca serapannya di dalam spektrofotometer UV-Vis, catat absorbansi maksimalnya (ada 2).
3. Teteskan NaOH 2M di dalamnya, baca serapannya, catat absorbansi maksimalnya (ada 2)
4. Ukur serapan uji ditambah dengan $AlCl_3$
5. Ukur serapan uji ditambah dengan $AlCl_3 + HCl$
6. Ukur serapan uji ditambah dengan CH_3COONa
7. Ukur serapan uji ditambah dengan CH_3COONa dan H_3BO_3

Identifikasi struktur parsial flavonoid

Lakukan identifikasi struktur parsial flavonoid dengan pereaksi geser, catat panjang gelombang pada absorbansi maksimal

1. Dalam metanol
2. Dalam metanol sesudah ditambah NaOH.
3. Dalam metanol ditambah $MgSO_4$
4. Langkah 3 ditambah HCl
5. Langkah 1 ditambah asam borat.

Ringkasan urutan pengukuran serapan maksimal dengan penambahan pereaksi geser



Persiapan pretest Identifikasi Struktur Parsial

Tuliskan reaksi yang terjadi untuk hasil masing-masing penambahan pereaksi geser.
Beri penjelasan mengapa panjang gelombang pada absorbansi maksimal dapat bergeser?

Persiapan pretest penentuan struktur parsial

1. Apa nama kromatografi yang penolannya dalam bentuk pita dengan fase diam yang lebih lebar?
2. Apa fungsi penambahan NaOH pada penetapan struktur parsial flavonoid dengan spektrofotometer.
3. Apa fungsi penambahan NaOH, $NaHCO_3$, Asam borat, $AlCl_3$, HCl setelah ditambah $AlCl_3$, CH_3COONa

Daftar Pustaka

- Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Cetakan kedua, Penerbit ITB, Bandung.
- Sastrohamidjojo, H., 1991^a, *Spektroskopi*, Edisi Kedua, Cetakan Pertama, Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Sastrohamidjojo, H., 1991^b, *Kromatografi*, Edisi Kedua, Cetakan Pertama, Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Nurani, L.H., 2004, *Isolasi dan Identifikasi Struktur Parsial Flavonoid dari Daun Srikaya dan Uji Sitotoksitas pada Sel HeLa*, Tesis, Universitas Gadjah Mada

PERTEMUAN 2 GENERAL TEST

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan metode isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid dan identifikasi senyawa (CPMK 3).

Pelaksanaan:

General test dilakukan di pekan pertama, satu pekan sebelum praktikum.

Materi Praktikum:

Percobaan	Materi	Bahan
P1	Isolasi Minyak Atsiri	Batang Sereh
P2	Isolasi Minyak Atsiri	Rimpang kencur
P3	Isolasi Alkaloida	Biji merica
P4	Isolasi Poliketida	Usnea thallus
P5	Isolasi Glik. Flavonoid	Daun ketela pohon
P6	Identifikasi Struktur Parsial Glik. Flavonoid	Daun ketela pohon

Kegiatan general test dikoordinir oleh dosen praktikum.

**PERTEMUAN 3
(PRETES P1)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MINYAK ATSIRI**

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa dapat menyelesaikan masalah dalam isolasi minyak atsiri terkait dengan komponen minyak atsiri, sifat fisikokimia, teknik ekstraksi dan identifikasinya.

Dasar Teori

Minyak atsiri (minyak menguap, minyak eteris. minyak esensial) adalah minyak yang mengandung berbagai komponen kimia, bersifat mudah menguap serta mempunyai bau khas aromatik. Minyak atisir yang ditemukan di berbagai bagian tanaman, baik bagian daun, batang, bunga, biji, akar dan buah.

Hampir semua minyak atsiri terdiri dari campuran kimia yang cukup kompleks; dan sangat bervariasi dalam komposisi kimianya. Konstituen kimia minyak atsiri dapat dibagi menjadi 2 berdasarkan asal biosintetiknya:

1. Turunan terpen yang terbentuk melalui jalur asam asetat mevalonat,
2. Fenil propanoid/ senyawa aromatik yang terbentuk melalui jalur asam sikimat

Ekstraksi minyak atsiri dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain:

1. Destilasi
2. Ekstraksi pelarut
3. Pengepresan
4. Enfleurage
5. Ekstraksi CO₂ superkritis

Pengujian Minyak Atsiri

1. Analisis organoleptik untuk menentukan warna, bau, rasa, transparansi
2. Kandungan senyawa utama minyak atsiri dengan KLT dan GC MS
3. Reaksi identifikasi minyak atsiri
4. Penentuan indeks bias, bilangan asam, rotasi optik, bobot jenis dll.

Prinsip kerja destilasi:

Distilasi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan minyak atsiri dari suatu bahan baku alami (simplisia). Prinsip kerja dari alat destilasi Stahl dapat dipelajari di Materia Medika. Alat destilasi dirakit sedemikian rupa sehingga dengan alat ini dapat dilakukan penyulingan dengan air dari simplisia, sedang destilat yang terdiri dari campuran antara minyak atsiri dan air, dapat tertampung dalam penampung, jika penampung berskala maka volume minyak atsiri yang tertampung dapat terbaca.

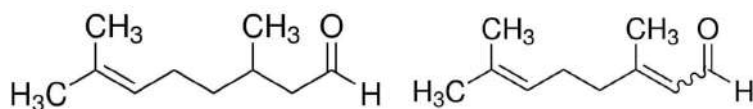
Identifikasi Komponen Minyak atsiri

Komponen minyak atsiri umumnya adalah monoterpen dan seskuiterpen. Untuk identifikasi komponen minyak atsiri dapat dilakukan dengan kromatografi gas (GC) yang digabung dengan spektrometri massa (MS). Kebanyakan terpen memberikan fragmentasi yang khas. Kombinasi GC-MS dapat digunakan untuk penentuan struktur kimia atau identifikasi senyawa alam, bahan hayati dan hasil sintesis, terutama yang mudah menguap. Identifikasi tersebut dapat dilakukan dengan membandingkan spektrum massa zat murni serta fragmentasinya. Instrumen GC-MS biasanya dilengkapi dengan library yang memuat pola fragmentasi dari berbagai senyawa. Dengan GC juga dimungkinkan dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatif.

Ada lebih dari 150 jenis minyak yang bisa diekstraksi. Minyak ini memiliki sifat terapeutik, psikologis dan fisiologis yang meningkatkan kesehatan dan mencegah penyakit. Semua minyak atsiri memiliki penyembuhan yang unik dan sifat antiseptik. Beberapa minyak bersifat antivirus, antiinflamasi, pereda nyeri, antidepresan, stimulasi, relaksasi, ekspektoran, mendukung pencernaan dan juga memiliki sifat diuretik. Selain banyak diaplikasikan dalam bidang farmasi, minyak atsiri banyak dimanfaatkan sebagai aromaterapi, aplikasi makanan, parfum, sanitasi dan berbagai produk kecantikan.

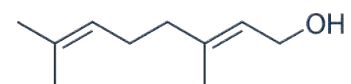
Contoh minyak atsiri

Serai wangi (*Cymbopogon nardus*) mengandung komponen utama seperti sitronelal, sitronelol, geraniol
Serai dapur (*Cymbopogon citratus*) mengandung komponen utama seperti sitral



Sitronelal

Sitral



Geraniol

Evaluasi

1. Uraikan sifat fisika kimia minyak atsiri!
2. Bagaimana cara ekstraksi minyak atsiri?
3. Bagaimana identifikasi komponen minyak atsiri?

Daftar Pustaka

1. Shah, B, and Seth, AK, 2010, Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry, First Edition, Elsevier, New Delhi India
2. Naeem, A, Abbas, T, Ali, TM, Hasnain, AH, 2018, Essential Oils: Brief Background and Uses, Annals of Short Reports, Volume 1, Issue 1, 1006
3. Mulyaningsih, S, dkk, 2022, Formulasi Mikroemulsi Gel Anti Acne Kombinasi Minyak Kayu Manis dan Minyak Sereh Wangi : Tinjauan Aktivitas Antibakteri, Sifat Fisik, dan Stabilitas Termodinamik. Laporan Penelitian

PERTEMUAN 4
(PRAKTIKUM P1)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MINYAK ATSIRI

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Menerapkan kemandirian, kerjasama dan komunikasi dalam kerja tim isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa melakukan ekstraksi minyak atsiri dan identifikasinya dengan Kromatografi lapis tipis (KLT).

Bahan

50 gram daun serai

Alat

Perangkat alat destilasi Stahl (Gambar 8) dan Perangkat KLT



Gambar 8. Alat distilasi Stahl

Cara kerja:

1. Pasang alat destilasi Stahl sesuai petunjuk.
2. Masukkan 50 g simplisia, dan diisi aquades hingga setengah labu.
3. Destilasi selama 2 jam.
4. Pisahkan minyak atsiri dari air
5. Ukur minyak yang diperoleh untuk mengetahui rendemen.
6. Simpan pada flakon tertutup dan terlindung dari cahaya.

7. Identifikasi menggunakan metode KLT dengan pembanding eugenol Identifikasi secara kromatografi lapis tipis dengan sistem sebagai berikut:

Fase diam : Silika gel GF 254 Fase gerak : Toluene-etil asetat (9:1)

Cuplikan : larutan minyak atsiri dalam etanol dan larutan pembanding timol

Deteksi : sinar ultraviolet 254, 366 nm dan disemprot vanilin/anisaldehyd asam sulfat.

Evaluasi

1. Bagaimana cara menghitung rendemen minyak atsiri?
2. Bagaimana prinsip ekstraksi minyak atsiri dengan distilasi?
3. Bagaimana mengetahui kemurnian minyak atsiri?

Daftar Pustaka

1. Kemenkes, 2017. Farmakope Herbal Indonesia Edisi II
2. Shah, B, and Seth, AK, 2010, Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry, First Edition, Elsevier, New Delhi India
3. Naeem, A, Abbas, T, Ali, TM, Hasnain, AH, 2018, Essential Oils: Brief Background and Uses, Annals of Short Reports, Volume 1, Issue 1, 1006

PERTEMUAN 5**(PRETES P2)****ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ETIL PARA-METOKSI SINAMAT****Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:**

Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan metode isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa memahami tentang sifat fisikokimia etil para metoksi sinamat dan teknik ekstraksinya.

Dasar Teori

Kencur (*Kaempferia galanga* L.) merupakan tanaman obat yang telah digunakan oleh masyarakat Indonesia secara turun temurun dan termasuk dalam famili Zingiberaceae. Etil para metoksisinamat merupakan kandungan kimia utama rimpang kencur. Sebagai turunan senyawa fenol, etil para metoksi sinamat dapat dideteksi dengan pereaksi yang merupakan senyawa aldehid seperti anisaldehyd asam sulfat dan vanilin asam sulfat. Sebagai ester asam sinamat dengan gugus fenol yang termetilasi, polaritasnya relatif tidak tinggi. Etil para metoksi sinamat merupakan komponen utama secara kuantitatif dari rimpang kencur yang dapat diekstraksi dengan etanol dan kristalisasi melalui pemekatan dan pendinginan.

Sifat Kimia

Titik lebur 49°C, Titik didih 187 °C / 15 mmHg

Densitas 1,080±0,06 g/cm³ (Diprediksi)

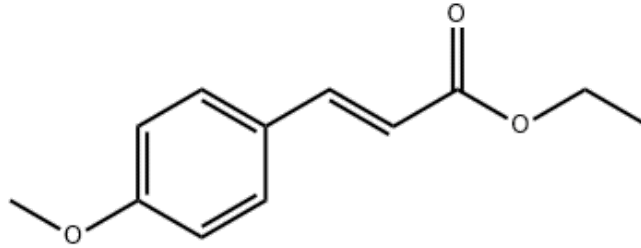
Kelarutan: Larut baik dalam heksan, petroleum eter tetapi juga larut dalam etanol, metanol, etanol, DMSO dan pelarut organik lainnya.

Kelarutan Air: tidak larut dalam air

Sifat fisik: Bentuk Kristal Warna putih kusam seperti terlihat pada Gambar 9.

Suhu penyimpanan: disimpan dalam keadaan kering, Suhu Kamar

Penggunaan Ethyl p-methoxycinnamate merupakan turunan dari asam 4-methoxycinnamic, agen antihiperqlikemik/hipoglikemik yang bekerja dengan merangsang sekresi insulin dari pankreas dan dapat dikembangkan menjadi potensi baru untuk agen terapi yang digunakan pada pasien diabetes tipe 2.



Gambar 9.. Struktur etil-p-metoksisinamat

Senyawa etil p-metoksisinamat diketahui merupakan senyawa utama dari *Kaempferia galanga* dan banyak digunakan dalam kosmetik serta mempunyai beberapa aktivitas antiinflamasi, anti jamur (Wahyuni et al., 2021).

Evaluasi

1. Jelaskan prinsip maserasi dalam ekstraksi senyawa
2. Apa yang dimaksud remaserasi?
3. Jelaskan kelebihan dan kekurangan maserasi

Daftar pustaka

Hesti Riasari, H, Rachmaniar, R, Febriani Y, The Determination of ethyl p-methoxy cinnamate in *Kaempferia galanga* L rhizome Extract Harvested in Rainy and Dry Seasons, 2016; Vol. 7(4): 1746-1749

Kemenkes RI, 2018, Farmakope Herbal Indonesia edisi II

Nurani LH, Asahi A, Susanti H. Determination of epms contentand anti-inflammatory test rhizome extract *Kaempferia galanga*, L by inhibition of protein denaturation method. *Pharmaciana*. 2020;10(3):381-90. doi:10.12928/pharmaciana.v10i3.15293.

Wahyuni IS, Sufiawati I, Nittayananta W, Levita J. Identification of ethyl para-methoxycinnamate and kaempferol in the ethanolextract of *Kaempferia galanga* L. Rhizome as biomaterial for drug candidate using spectrophotometric and chromatographic analysis. *Mater Sci Forum*. 2021;1028:371-6. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.1028.371.

https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5205790.htm

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-p-methoxycinnamate#section=Substances>

PERTEMUAN 6
(PRAKTIKUM P2)

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ETIL PARA-METOKSI SINAMAT

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Menerapkan kemandirian, kerjasama dan komunikasi dalam kerja tim isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa melakukan isolasi etil para metoksi sinamat dengan metode maserasi dan mengidentifikasi dengan KLT.

Bahan

100 gram serbuk kasar rimpang kencur dan etanol 95% 300 ml

Alat

Botol kaca bertutup 2 buah (dibawa mahasiswa)

Rotary evaporator

Perangkat penangas air 1 unit dan Cawan porselin 1 buah

Perangkat KLT 1 buah.

Cara kerja:

Minggu Pertama

100 g serbuk rimpang kencur dimasukkan ke dalam botol bertutup yang bersih, ditambah 200 ml etanol 95% kemudian digojog selama 2 jam. Selanjutnya diamkan termaserasi selama 2 minggu dalam suhu kamar sambil sering digojog (dibawa pulang dan sesekali digojog).

Minggu Kedua

Dilakukan penyaringan sehingga didapat maserat. Diuapkan dengan evaporator hingga volume ± 10 ml. Tuangkan cairan ke dalam botol kaca kecil bertutup. Sisa sisa zat yang tertinggal pada cawan porselin dicuci dengan 5 ml etanol 95% dan dicampurkan ke dalam botol. Selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin dengan tujuan kristalisasi.

Setelah terbentuk kristal, kristal yang diperoleh dipisahkan dari cairannya dengan menuangkannya ke dalam corong yang diberi kertas saring yang telah ditimbang.

Kristal pada kertas saring dibiarkan mengering pada lemari asam (tidak perlu dalam oven).

Setelah kering, dilakukan karakterisasi kristal meliputi

1. Organoleptik
2. Penghitungan rendemen kristal/isolat
3. mengukur titik lebur dan dibandingkan terhadap standar
4. Identifikasi secara kromatografi lapis tipis dengan sistem sebagai berikut:

Fase diam: Silika gel G

Fase gerak: toluen

Cuplikan: larutan isolat dalam etanol dan larutan pembanding etil para metoksi sinamat.

Deteksi: sinar ultraviolet 366 nm.

Evaluasi

1. Bagaimana sifat fisika kimia etil p-metoksi sinamat
2. Apakah mengetahui kemurnian isolat etil p-metoksi sinamat yang diisolasi
3. Bagaimana cara menentukan Rf

Daftar Pustaka

Hesti Riasari, H, Rachmaniar, R, Febriani Y, The Determination of ethyl p-methoxy cinnamate in *Kaempferia galanga* L rhizome Extract Harvested in Rainy and Dry Seasons, 2016; Vol. 7(4): 1746-1749

Kemenkes RI, 2018, Farmakope Herbal Indonesia edisi II

Nurani LH, Asahi A, Susanti H. Determination of epms content and anti-inflammatory test rhizome extract *Kaempferia galanga*, L by inhibition of protein denaturation method. *Pharmaciana*. 2020;10(3):381-90. doi:10.12928/pharmaciana.v10i3.15293.

Wahyuni IS, Sufiawati I, Nittayananta W, Levita J. Identification of ethyl para-methoxycinnamate and kaempferol in the ethanolextract of *Kaempferia galanga* L. Rhizome as biomaterial for drug candidate using spectrophotometric and chromatographic analysis. *Mater Sci Forum*. 2021;1028:371-6. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.1028.371.

https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5205790.htm

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-p-methoxycinnamate#section=Substances>

PERTEMUAN 7
(PRETEST P3)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ALKALOID

Tujuan mendalaman materi:

1. Mahasiswa memahami tentang pengertian alkaloid, penggolongan tata nama, sifat fisikokimia dan teknik ekstraksinya.
2. Mahasiswa dapat menentukan cara identifikasi alkaloid
3. Mahasiswa mampu melakukan isolasi dan identifikasi piperin dari biji merica.

Prinsip kerja

Piperin merupakan senyawa alkaloid. Piperin berupa senyawa amida basa lemah yang dapat membentuk garam dengan asam mineral kuat. Piperin dihidrolisis dengan KOH-etanolik akan menghasilkan kalium piperinat dan piperidin. Tumbuhan yang termasuk jenis piper ini selain mengandung 5-9% piperin juga mengandung : minyak atsiri berwarna kuning berbau aromatis, senyawa berasa pedas (kavisin), amilum, resin, protein. Senyawa piperin secara fisik berupa kristal berbentuk jarum berwarna kuning, tak berbau, tak berasa lama kelamaan pedas, larut dalam etanol asam cuka, benzene dan kloroform. Piperin disari dari buah piper dengan etanol 96 %, dipisahkan dari senyawa resin dengan penambahan KOH-etanol 10% b/v. kristalisasi dilakukan dengan etanol.

PERTEMUAN 8
(PRAKTIKUM P3)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ALKALOID

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Menerapkan kemandirian, kerjasama dan komunikasi dalam kerja tim

Bahan Percobaan

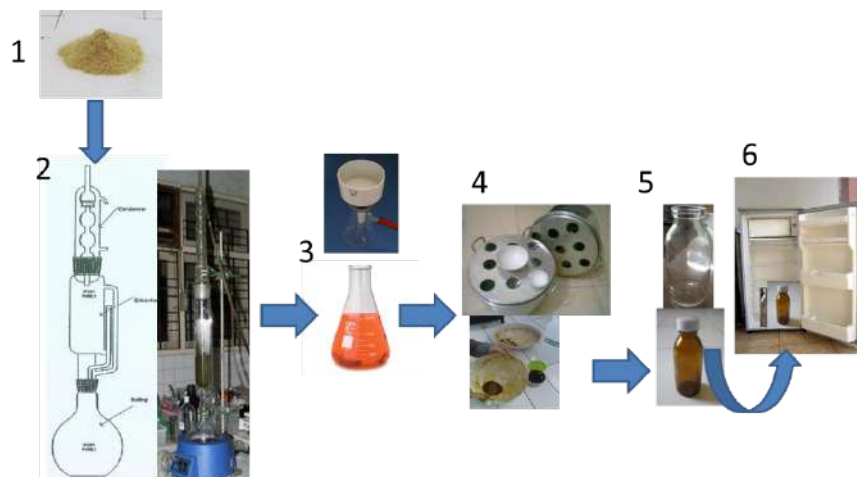
Serbuk buah piper nigrum atau album, Etanol 96% (teknik), KOH-etanolik 10 %, silica gel F 254, benzene, etil asetat, pereaksi semprot Dragendorff.

Alat Percobaan

Perangkat penyari Soxhlet (volume ekstraktor 100 ml), kompor dengan penangas air atau *heating mantle*, batang pengaduk, cawan porselin, corong, perangkat KLT.

Cara kerja

Skema cara kerja isolasi dan identifikasi alkaloid piperin dalam lada dapat dilihat pada Gambar 10.. Tahapan cara kerja isolasi dan identifikasi alkaloid piperin dibagi menjadi 4 tahapan.



Gambar 10. Skema kerja isolasi alkaloid piperin dalam buah lada

Tahap 1

Timbang 30-40 g serbuk merica, masukkan ke dalam kertas saring. Serbuk yang telah terbungkus kertas saring dimasukkan ke alat penyari Soxhlet dan tambahkan etanol teknik 96% sebanyak 2 kali sirkulasi. Penyarian dilakukan selama 2 jam dengan kecepatan 6 – 8 sirkulasi per jam. Setelah dingin, ambil filtrate jernih dalam labu dan sisihkan 3 ml sari jernih dalam flakon tutup.

Tahap 2.

Filtrat diuapkan di atas penangas air sampai lebih kurang 20 ml (terlihat sebagai ekstrak kental). Ekstrak kental didiamkan hingga suhu kamar, kemudian ditambah 10 ml KOH-etanolik 10% sambil diaduk sehingga timbul endapan sempurna. Setelah mengendap, pisahkan sari dari bagian yang tidak larut melalui glass wool atau dengan kertas saring yang dibasahi etanol. Sari jernih yang didapat dimasukkan flakon atau botol kecil dan didiamkan dalam almari es sampai hari praktikum berikutnya hingga terbentuk kristal. Beri etiket yang jelas dalam flakon atau botol tersebut.

Tahap 3.

Kristal yang diperoleh dipisahkan dari cairan dengan cara disaring menggunakan kertas saring yang sudah ditara/ditimbang. Kristal dicuci dengan etanol 96% (dingin) dan dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 40 °C selama 30 - 45 menit dan hitung rendemennya kemudian disimpan dalam eksikator yang dilengkapi kapur tohor.

Tahap 4.**Analisis kristal piperin dengan kromatografi lapis tipis (KLT)***1. Penyiapan larutan sampel*

Buat larutan piperin dengan konsentrasi 1 mg/mL (0,1%b/v) dalam metanol. Sebagai pembanding gunakan piperin standar, dibuat 1 mg/mL dalam metanol. Cara membuat larutan piperin 1 mg/mL ialah timbang piperin sebanyak 5,0 mg dan dilarutkan dalam labu ukur dengan metanol hingga volumenya 5,0 mL.

2. Penjenuhan bejana

Siapkan eluen sebanyak 10 mL, yang terdiri dari campuran toluen dan etil asetat dengan perbandingan 7:3. Masukkan campuran eluen ke dalam bejana. Segera masukkan kertas saring (yang panjang) ke dalam bejana kemudian tutup rapat. Biarkan bejana jenuh terhadap eluen, dengan dibiarkan sampai kertas saring basah.

3. Penyiapan plat kromatografi

Ambil plat kromatografi (silika GF₂₅₄) dengan ukuran 5 x 10 cm. Ukur 1 cm dari bawah sebagai batas tempat penotolan dan 8 cm dari batas penotolan sebagai batas elusi. Tandai tempat yang sudah diukur dengan pensil.

4. Penotolan sampel

Ambil sampel sebanyak 5 µL dengan pipa kapiler. Totolkan sampel sedikit demi sedikit pada plat

kromatografi 1 cm dari bawah. Tunggu kering terlebih dahulu untuk menotolkan sampel berikutnya.

5. Pengembangan (Elusi)

Plat kromatografi yang telah ditotolkan sampel dimasukkan ke dalam bejana yang telah jenuh oleh eluen. Pengembangan dilakukan sampai eluennya naik ke atas dan telah sampai pada batas atas yang sebelumnya telah ditandai. Setelah eluen sampai pada batas atas, ambil plat kromatografi dan angin-anginkan.

6. Identifikasi senyawa

Senyawa diidentifikasi dengan meletakkan plat kromatografi di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254, 366 dan sinar tampak. Lingkari spot dengan pensil. Ukur jaraknya dengan penggaris dari titik awal penotolan sampai titik tengah spot. Hitung Rf dari semua bercak yang muncul. Sewaktu menyinari di bawah lampu UV, Plat kromatografi difoto dan dilampirkan di lampiran laporan resmi.

Tahap 5

Identifikasi Kristal hasil isolasi

1. Analisis organoleptis meliputi warna, bau, bentuk kristal (ditulis di data percobaan).
2. Hasil pengukuran jarak lebur menggunakan alat ukur *melting point* (ditulis di data percobaan).
3. Bandingkan hasil pengukuran jarak lebur yang diperoleh dengan teori, apa kesimpulan anda terhadap hasil tersebut ? (dibahas di pembahasan).
4. Hasil analisis dengan KLT, bandingkan dengan pustaka dari bercak yang tampak berdasarkan nilai Rf dan karakteristiknya di UV254, UV366 dan sinar tampak.
5. Serahkan sisa kristal yang diperoleh kepada petugas laboratorium dalam flakon yang diberi nama kristal dari tanaman apa dan nama kelompok.

Penilaian Praktikum

1. Rubrik penilaian Praktikum & kerjasama

Kriteria	80-90	70-<80	60-<70
1. Mengerjakan praktikum sesuai buku petunjuk	Mengerjakan praktikum sesuai 6 kriteria	Mengerjakan praktikum sesuai minimal 5 kriteria	Mengerjakan praktikum sesuai minimal 3 kriteria
2. Tertib dalam mengerjakan praktikum			
3. Menerapkan K3			
4. Kerjasama dalam tim baik			
5. Mandiri (tidak tergantung asisten)			
6. Menyelesaikan praktikum sesuai target/jadwal			

Penilaian Laporan Praktikum

2. Rubrik penilaian laporan

Skor	Kriteria	Poin penilaian
0	Tidak memenuhi semua poin penilaian	1. Hasil praktikum ditampilkan jelas
1	Memenuhi 1 poin penilaian	2. Pembahasan hasil mendalam
2	Memenuhi 2 poin penilaian	3. Bagian-bagian laporan lengkap
3	Memenuhi 3 poin penilaian	4. Rapi dan sistematis
4	Memenuhi 4 poin penilaian	5. Tepat waktu penyerahan laporan
5	Memenuhi 5 poin penilaian	

$$\text{Nilai} = (\text{skor} \times 100) : 5$$

PERTEMUAN 9
(PRETEST P4)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI POLIKETIDA

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan metode isolasi minyak atsiri, alkaloid, poliketida, dan flavonoid.

Tujuan Percobaan

Pada akhir praktikum diharapkan mahasiswa paham dan trampil melakukan isolasi asam usnat, dan melakukan identifikasi hasil isolasi secara kualitatif menggunakan cara KLT.

Dasar Teori

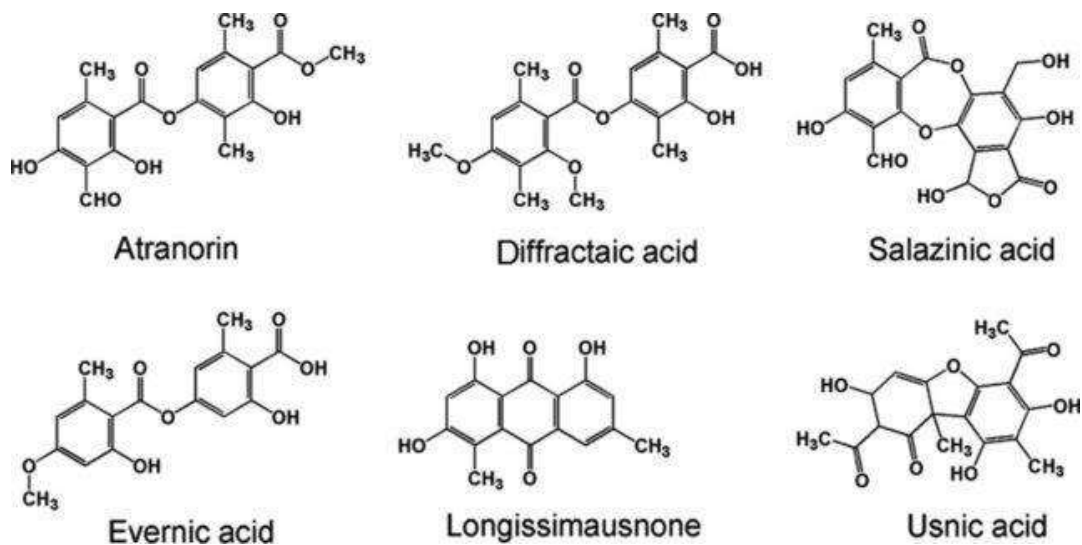
Senyawa poliketida adalah senyawa metabolit sekunder dari bahan alam yang disintesis dari prekursor yang berupa rantai keton atau bentuk alternatif dari keton (bentuk reduksi dari keton) dan gugus metilen (-CO-CH₂-). Salah satu senyawa poliketida yang banyak dimanfaatkan untuk obat adalah asam usnat yang banyak terdapat dalam lichen seperti *usnea thalus*. Sifat fisika kimia asam usnat diantaranya titik lebur 204°C, kelarutan dalam air 25 °C (g/100 ml) <0,01, [aseton](#) 0,77; [etil asetat](#) 0,88; [fural](#), 7,32; [furfuryl alcohol](#) 1,21.

Usnea thalus (Gambar 11) sering ditemukan tergantung di pohon, sekitar kurang lebih ada 300 spesies *usnea* di dunia dan 60 spesies di India. *Usnea thalus* merupakan tanaman tingkat rendah dari genus *usnea* Dill. ex Adans. anggota familia *Parmeliaceae* (*Ascomycota*) yang merupakan hasil simbiosis kompleks asosiasi antara mycobiont dan photobiont. Beberapa spesies dari genus lichen ini telah digunakan secara tradisional sebagai obat-obatan di Cina, Mesir, Yunani, India, Timur Tengah dan Eropa sejak zaman kuno.

Asam usnat merupakan salah satu kandungan aktif dari senyawa lichen dan berkhasiat sebagai antibakteri. Selain terdapat dalam spesies *usnea*, asam usnat ini juga terdapat di dalam lichen-lichen yang lain seperti: *Alectoria*, *Ramalina*, *Everinea*, *Cetraria*, *Cladonia*, *Lacanora*, dan *Hematoma*. Dilihat dari struktur kimia, asam usnat merupakan derivat dibenzofuran. Struktur kandungan kimia poliketida dalam *usnea thalus* dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 11. Usnea thallus

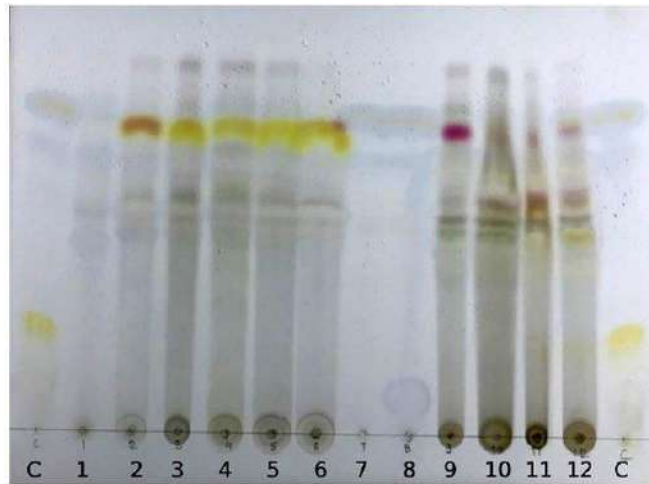


Gambar 12. Senyawa poliketida dalam usnea thalus

Genus *Usnea* mengandung banyak kandungan kimia, terutama termasuk cincin fenil monosubstitusi, depsida, antrakuinon, dibenzofuran, steroid, terpen, asam lemak dan polisakarida, dengan aktivitas biologis seperti antitumor, antibiotik, antimikroba, anti-inflamasi, antioksidan dan antitrombosis. Ada 4 spesies *Usnea* yang banyak diteliti, yaitu. *Usnea aciculifera* Van., *Usnea ghattensis* G. Awasthi, *Usnea longissima* Ach. (UL) dan *Usnea stigmatoides* G. Awasthi (AS). Kandungan kimia dari usnea tersebut seperti atranorin (\pm), barbatik, asam konstik, difraktaat, asam evernat, fumarprotocetraric, galbinat, glutinol, asam lecanoric, menegazziaic, norstictic, asam 4-0-demethylbarbatic, asam squamatic, asam stictic dan asam usnat dan lain-lain. Senyawa poliketida dalam usnea yaitu depsida, depsidon, dibenzofuran dan depson. Asam evernat (depsida) dan asam usnat (dibenzofuran) adalah dua poliketida penting yang hanya ada dalam lichen.

Metode pengekstraksian asam usnat dari hasil penelitian menyatakan asam usnat dapat diekstraksi dengan metode refluks, Soxhlet, maserasi dan ekstraksi ultrasonik dengan hasil rendemen

yang berbeda-beda. Ekstraksi dengan cara panas menghasilkan rendemen yang lebih banyak. Analisis kromatografi lapis tipis dari ekstrak asam usnat yang diekstraksi pada berbagai pelarut dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Kromatogram lapis tipis ekstrak usnea thalus pada berbagai pelarut (1 & 2 natural thallus, 3 ethanol, 4 methanol, 5 ethyl acetate, 6 acetone extract) and *Cetrelia braunsiana* (7 & 8 natural thallus, 9 ethanol, 10 methanol, 11 ethyl acetate, 12 acetone extract)

Daftar Pustaka

- Agnieszka Galanty, Paweł Paśko, Irma Podolak and Paweł Zagrodzki, 2020, Optimization of usnic acid extraction conditions using fractional factorial design, *The Lichenologist*, 52, 397–401.
- DepKes RI., 2017, Farmakope Herbal Indonesia, Jakarta.
- Harborne, J.B., 1987, *Phytochemical Methods*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padamawinata, Edisi II, Penerbit ITB, Bandung.
- Hitendra Yadav, Sanjeeva Nayaka and Manish Dwivedi, 2021, Analytics on Antimicrobial Activity of Lichen Extract, *J Pure Appl Microbiol*, 15(2):701-708.
- Robinson T., 1991, *The Organic Constituent of Higher Plants*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padamawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Shweta Singh, Sayyada Khatoun, Yogesh Joshi, Siddhartha Prgyadeep, Dalip Kumar Upreti, and Ajay Kumar Singh Rawat, 2016, A Validated HPTLC Densitometric Method for Simultaneous Determination of Evernic and Usnic Acids in Four Usnea Species and Comparison of Their Antioxidant Potential, *Journal of Chromatographic Science*, 2016, Vol. 54, No. 9, 1670–1677

Tugas:

1. Apa yang disebut dengan senyawa poliketida?
2. Gambarkan struktur poliketida yang akan saudara isolasi, dan jelaskan
 - a. Tuliskan nama senyawa poliketida yang anda isolasi.
 - b. Bagaimana kepolaran dari senyawa poliketida tersebut tersebut?

- c. Gugus apa saja yang terdapat dalam struktur poliketida tersebut.
3. Metode apa yang digunakan pada isolasi poliketida tersebut. Pelarut apa yang digunakan dan mengapa demikian?
 4. Gambarkan struktur pelarut-pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi usnea thalus dan bagaimana polaritasnya?
 5. Apa guna penambahan kloroform pada isolasi tersebut?
 6. Bagaimana sistem kromatografi yang digunakan, fase diam dan fase gerak?
 7. Bagaimana karakteristik bercak kromatogram jika,
 - a. Dilihat di bawah sinar UV 254
 - b. Dilihat di bawah sinar UV 366
 - c. Disemprot dengan FeCl_3 dan diamati di bawah sinar tampak.
 8. Tuliskan reaksi yang terjadi pada identifikasi dengan pereaksi semprot FeCl_3 .

Tabel Penilaian

Kompetensi	4 (80-100)	3 (65-79)	2 (50-64)	1 (<50)
Kesesuaian dengan judul percobaan	Aktif dalam mengemukakan pendapat yang relevan dan signifikan	Mengemukakan pendapat yang relevan namun tidak signifikan	Mengemukakan pendapat yang tidak relevan dan tidak signifikan	Tidak Mengemukakan pendapat sama sekali
Keaktifan menjawab	Aktif menjawab pertanyaan yang sudah dituliskan pada Form data hasil maupun pertanyaan pengampu	Beberapa kali menjawab pertanyaan yang sudah dituliskan pada Form data hasil maupun pertanyaan pengampu	Sesekali menjawab pertanyaan yang sudah dituliskan pada Form data hasil maupun pertanyaan pengampu	Tidak mencoba menjawab sama sekali
Responsif	Langsung menjawab Ketika diberi pertanyaan	Perlu waktu berfikir sebentar sebelum menjawab ketika diberi pertanyaan	Perlu waktu berfikir lama sebelum menjawab ketika diberi pertanyaan	tidak menjawab ketika diberi pertanyaan
Kemampuan	Semua jawaban yang diberikan benar	Sebagian jawaban yang diberikan benar	Semua jawaban yang diberikan kurang tepat	Semua jawaban yang diberikan tidak tepat

Keingintahuan	Aktif bertanya dengan pertanyaan yang relevan dengan topik yang dipraktikumkan	Kadang bertanya dengan pertanyaan yang relevan dengan topik yang dipraktikumkan	bertanya dengan pertanyaan yang tidak relevan dengan topik yang dipraktikumkan	Tidak mengajukan peranyaan sama sekali
---------------	--	---	--	--

PERTEMUAN 10
(PRAKTIKUM P.4)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI POLIKETIDA

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Menerapkan kemandirian, kerjasama dan komunikasi dalam kerja tim.

Bahan Percobaan

Serbuk usnea (yang berwarna kekuningan), aseton teknik, heksana pa, kloroform pa, aseton pa, etil asetat pa, asam asetat glasial, etil asetat pa, lempeng KLT silika gel GF 254, pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat, FeCl_3 , 2,4-dinitro fenilhidrasin.

Alat Percobaan

Seperangkat alat Soxhlet, gelas ukur 100 ml, corong gelas, cawan Petri, Erlenmeyer 100 ml, bejana Kromatografi, *heating mantle*, alat pengukur titik lebur.

Cara kerja

Skema kerja isolasi asam usnat dalam usnea thalus dapat dilihat pada Gambar.

Tahap I :

1. Ditimbang 25 gram serbuk usnea sp dan dibungkus dengan kertas saring
2. dimasukkan dalam alat Soxhlet bagian extraction thimble
3. Rangkaikan dengan labu alas bulat 250 ml yang telah diberi batu didih 2-5 butir(anti bumping granules).
4. Tambahkan acetone secukupnya sampai terjadi 2 kali sirkulasi.
5. Lakukan penyarian dengan alat Soxhlet selama 1,5 jam. Hasil penyarian dinginkan pada suhu kamar kemudian saring.
6. Uapkan filtrat yang diperoleh sehingga asetonnya habis dengan evaporator.
7. Residu dilarutkan dalam kloroform dengan cara digojog dua kali, setiap kali menggunakan 25 ml kloroform.
8. Saring melalui kertas saring, tampung dalam botol bersih.
9. Uapkan kloroform dengan evaporator sehingga kloroformnya habis.

10. Tambahkan 5 ml aseton ke dalam labu untuk melarutkan residu.
11. Tuangkan campuran ke dalam botol kecil yang bersih dan kering.
12. Bilas labu dengan 5 ml aseton dan campurkan bilasan dengan larutan dalam botol, sampai padatan tepat larut. Simpan dalam almari pendingin sehingga terbentuk kristal.

Tahap II :

1. Kristal yang terbentuk dipisahkan dari cairannya dengan cara disaring dengan kertas saring yang telah ditara.
2. Bilas botol dengan etanol yang sudah didinginkan dalam freezer selama 1 jam, bilasan digunakan untuk mencuci kristal yang sudah ada pada kertas saring.
3. Kristal yang diperoleh dikeringkan dalam oven 50°C. Timbang hasilnya dan hitung randemennya.

Tahap III :

Analisis kristal asam usnat dengan kromatografi lapis tipis (KLT)

1. Penyiapan larutan sampel

Buat larutan kristal asam usnat dengan konsentrasi 1 mg/mL (0,1%b/v) dalam etilasetat. Sebagai pembanding gunakan asam usnat standar, dibuat 1 mg/mL dalam etilasetat. Cara membuat larutan piperin 1 mg/mL ialah timbang piperin sebanyak 5,0 mg dan dilarutkan dalam labu ukur dengan etilasetat hingga volumenya 5,0 mL.

2. Penjenuhan bejana

Siapkan eluen sebanyak 10 mL, yang terdiri dari campuran Heksana : Etilasetat : asam asetat dengan perbandingan 4:1:1. Masukkan campuran eluen ke dalam bejana. Segera masukkan kertas saring (yang panjang) ke dalam bejana kemudian tutup rapat. Biarkan bejana jenuh terhadap eluen, dengan dibiarkan sampai kertas saring basah.

3. Penyiapan plat kromatografi

Ambil plat kromatografi (silika GF₂₅₄) dengan ukuran 5 x 10 cm. Ukur 1 cm dari bawah sebagai batas tempat penotolan dan 8 cm dari batas penotolan sebagai batas elusi. Tandai tempat yang sudah diukur dengan pensil.

4. Penotolan sampel

Ambil sampel sebanyak 5 µL dengan pipa kapiler. Totolkan sampel sedikit demi sedikit pada plat

kromatografi 1 cm dari bawah. Tunggu kering terlebih dahulu untuk menotolkan sampel berikutnya.

5. Pengembangan (Elusi)

Plat kromatografi yang telah ditotolkan sampel dimasukkan ke dalam bejana yang telah jenuh oleh eluen. Pengembangan dilakukan sampai eluennya naik ke atas dan telah sampai pada batas atas yang sebelumnya telah ditandai. Setelah eluen sampai pada batas atas, ambil plat kromatografi dan angin-anginkan.

6. Identifikasi senyawa

Senyawa diidentifikasi dengan meletakkan plat kromatografi di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254, 366 dan sinar tampak. Lingkari spot dengan pensil. Ukur jaraknya dengan penggaris dari titik awal penotolan sampai titik tengah spot. Hitung Rf dari semua bercak yang muncul. Sewaktu menyinari di bawah lampu UV, Plat kromatografi difoto dan dilampirkan di lampiran laporan resmi.

Tahap IV

Identifikasi Kristal hasil isolasi

1. Analisis organoleptis meliputi warna, bau, bentuk kristal (ditulis di data percobaan).
2. Hasil pengukuran jarak lebur menggunakan alat ukur *melting point* (ditulis di data percobaan).
3. Bandingkan hasil pengukuran jarak lebur yang diperoleh dengan teori, apa kesimpulan anda terhadap hasil tersebut ? (dibahas di pembahasan).
4. Hasil analisis dengan KLT, bandingkan dengan pustaka dari bercak yang tampak berdasarkan nilai Rf dan karakteristiknya di UV254, UV366 dan sinar tampak.
5. Serahkan sisa kristal yang diperoleh kepada petugas laboratorium dalam flakon yang diberi nama kristal dari tanaman apa dan nama kelompok.

Deteksi:

1. Sinar UV 254, UV 366 mm dan sinar tampak.
2. Pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, panasi lempeng pada suhu 100 °C, selama 15 menit, atau pereaksi FeCl₃ dalam HCl 0,5 N atau Pereaksi 2,4 dinitrofenilhidrasin (larutan 2,4-DNP 0,4% dalam HCl 2 N).
3. Tentukan titik lebur kristal yang diperoleh dengan alat Tiele.

Penilaian Praktikum

1. Rubrik penilaian Praktikum & kerjasama

Kriteria	80-90	70-<80	60-<70
1. Mengerjakan praktikum sesuai buku petunjuk 2. Tertib dalam mengerjakan praktikum 3. Menerapkan K3 4. Kerjasama dalam tim baik 5. Mandiri (tidak tergantung asisten) 6. Menyelesaikan praktikum sesuai target/jadwal	Mengerjakan praktikum sesuai 6 kriteria	Mengerjakan praktikum sesuai minimal 5 kriteria	Mengerjakan praktikum sesuai minimal 3 kriteria

2. Rubrik penilaian laporan

Skor	Kriteria	Poin penilaian
0	Tidak memenuhi semua poin penilaian	1. Hasil praktikum ditampilkan jelas
1	Memenuhi 1 poin penilaian	2. Pembahasan hasil mendalam
2	Memenuhi 2 poin penilaian	3. Bagian-bagian laporan lengkap
3	Memenuhi 3 poin penilaian	4. Rapi dan sistematis
4	Memenuhi 4 poin penilaian	5. Tepat waktu penyerahan laporan
5	Memenuhi 5 poin penilaian	

Nilai = (skor x 100) : 5

PERTEMUAN 11
(PRETEST P5)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FLAVONOID

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

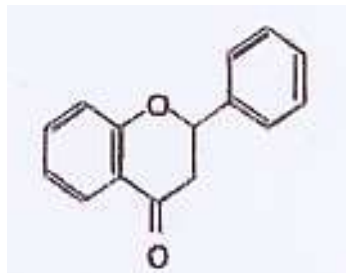
Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa dapat menyelesaikan masalah dalam isolasi flavonoid terkait dengan flavonoid dalam bentuk glikosida dan glikon, sifat fisikokimia, teknik ekstraksi dan identifikasinya.

Dasar Teori

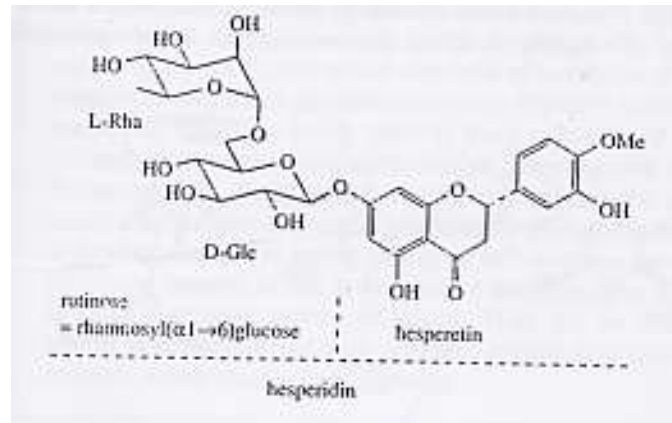
Kerangka dasar flavanoid terlihat pada Gambar 14, merupakan senyawa polifenol dengan kerangka dasar C₆C₃C₆ dengan atau tanpa cincin ketiga.:



Gambar 14. Senyawa golongan flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang banyak terdapat dalam tumbuhan. Flavonoid biasa ditemukan terikat dengan gula membentuk glikosida. Flavonoid O-glikosida mudah dihidrolisis dengan katalisis asam menghasilkan aglikon dan glikon.

Fungsi flavonoid bagi tanaman salah satunya adalah sebagai pigmen, misal antosian (flavonoid) yang banyak terdapat pada kelopak bunga. Khasiat flavonoid bagi manusia antara lain: vitamin P, untuk menghentikan perdarahan dan kerapuhan kapiler, dan juga sebagai pelengkap diet. Konstituen yang paling dikenal adalah rutin (dalam bentuk glikosida) dan quersetin (aglikon dari rutin).



Contoh yang dilakukan adalah Isolasi dan Identifikasi flavonoid dari daun ketela pohon.

Daun ketela pohon mengandung rutin yang diekstraksi dengan decocta, kemudian dikristalkan. Sebagian diambil dilarutkan dalam metanol (Sari I)

Rutin selanjutnya dihidrolisis dengan asam menghasilkan glikon dan aglikon.

Untuk memisahkan glikon dan aglikon difraksinasi menggunakan eter, sari eter (sari II) berisi aglikon dan sari air (Sari III) berisi glikon

Evaluasi

1. Uraikan sifat fisika kimia rutin dan quersetin!
2. Bagaimana cara ekstraksi rutin?
3. Bagaimana identifikasi komponen rutin dan quercetin?

Daftar Pustaka

- Markham, K., M., Anderson, 2006, *Flavonoids*, Chemistry, Biochemistry and Application, Taylor & Francis Group, Newyork.
- Sastrohamidjojo, H., 1991, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, Yogyakarta, Hal: 28-31, 34-35.
- Stahl E., 1985, *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.

PERTEMUAN 12
(PRAKTIKUM P5)
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FLAVONOID

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Menerapkan kemandirian, kerjasama dan komunikasi dalam kerja tim isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa melakukan ekstraksi flavonoid dan identifikasinya dengan Kromatografi lapis tipis (KLT).

Bahan

200 gram daun ketela pohon.

400 mL aquadest

Alat

Perangkat alat infundasi (Gambar 15).



Gambar 15. Alat Infundasi

Cara kerja:

1. Pasang alat infundasi sesuai petunjuk.
2. Didihkan air yang diisi di panci bawah.
3. Masukkan 200 g simplisia, dan diisi 400 mL aquadest.
4. Lakukan decoc selama 30 menit (panaskan panci yang berisi air dan simplisia di panci bawah).
5. Saring hasil decocta dengan kain flanel.
6. Simpan hasil decocta dalam labu, di dalam almari es

7. Pada saat praktikum berikutnya, saring kristal dengan buchner (pengambilan dari almari pendingin sesudah penyaring dengan buchner siap).
8. Larutkan sebagian kristal dalam metanol, sebagian dihidrolisis.
9. Lakukan hidrolisis sebagian kristal dengan air asam, dipanaskan 1 jam dalam tabung reaksi yang ditutup dengan corong dan disumpal kapas basah.
10. Hasil hidrolisis difraksi dengan eter menggunakan corong pisah.
11. Beri etiket: sari 1 untuk kristal yang dilarutkan metanol, sari 2 untuk hasil hidrolisis yang masuk fraksi eter; dan sari 3 untuk fraksi yang masuk dalam air.
12. Identifikasi menggunakan metode KKt dengan pembanding glukosa dan rutin.
13. Identifikasi secara kromatografi lapis tipis dengan sistem sebagai berikut:
 Fase diam : 2 buah Kertas Whatman untuk 2 sistem KKt
 Fase gerak : 1). BAW (4:5:1)
 Fase gerak: 2). Asam asetat 15 %
 Cuplikan : sari 1, 2, dan 3 serta larutan pembanding glukosa dan rutin.
 Deteksi : sinar tampak dilewatkan uap amonia, sinar ultraviolet 366 nm dan UV 366 setelah diuapi dengan amonia. Sesudah didokumentasi dilanjutkan hasil KKt disemprot $KmnO_4$.

Evaluasi

1. Bagaimana cara menghitung rendemen flavonoid?
2. Bagaimana prinsip ekstraksi glikosida flavonoid dengan decocta?
3. Bagaimana mengetahui kemurnian glikosida flavonoid?
4. Bagaimana cara melakukan hidrolisis?
5. Bagaimana cara melakukan fraksinasi?
6. Apa isi Sari 1, 2, dan 3?
7. Bagaimana menjelaskan bahwa hidrolisis sudah sempurna?

Daftar Pustaka

- Markham, K., M., Anderson, 2006, *Flavonoids*, Chemistry, Biochemistry and Application, Taylor & Francis Group, Newyork.
- Sastrohamidjojo, H., 1991, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, Yogyakarta, Hal: 28-31, 34-35.
- Stahl E., 1985, *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.

PERTEMUAN 13

(PRETEST P6)

IDENTIFIKASI STRUKTUR PARSIAL FLAVONOID

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

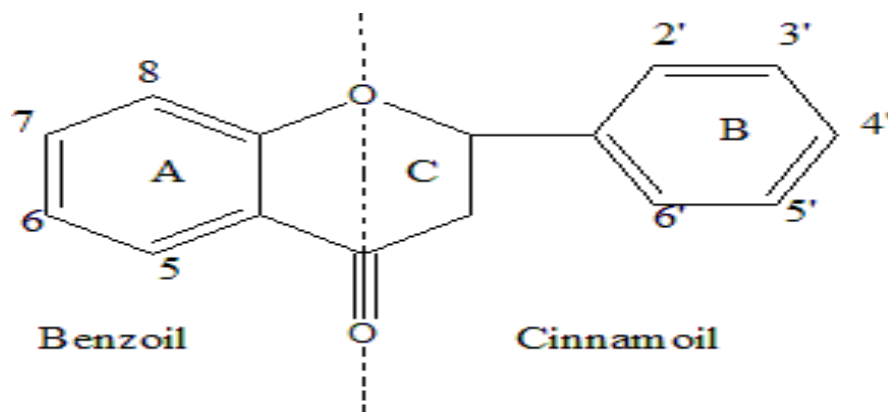
Tujuan

1. Mahasiswa mampu melakukan dentifikasi struktur parsial glikosida flavonoid
2. Mahasiswa dapat menerapkan teori dalam elusidasi struktur parsial flavonoid

Dasar Teori

Spektrofotometer dapat digunakan untuk mengidentifikasi jeniss flavonoid dan menentukan pola oksigenasinya. Spektrum UV flavonoid umumnya terdiri dari 2 puncak serapan maksimum, pada rentang panjang gelombang 240-285 nm (pita II) dan pada 300-400 nm (pita I). Pita II terbentuk dari cincin benzoil A, sedangkan pita I dihasilkan dari cincin cinnamoil.

Spektrofotometer dapat digunakan untuk mengidentifikasi jeniss flavonoid dan menentukan pola oksigenasinya. Spektrum UV flavonoid umumnya terdiri dari 2 puncak serapan maksimum, pada rentang panjang gelombang 240-285 nm (pita II) dan pada 300-400 nm (pita I). Pita II terbentuk dari cincin benzoil A, sedangkan pita I dihasilkan dari cincin cinnamoil B.



STRUKTUR INTI FLAVONOID

Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan peresaki geser ke dalam larutan cuplikkan dan mengalami pergeseran puncak serapan. Metode ini secara tidak langsung juga berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol. Pereaksi geser yang biasa digunakan adalah NaOH, AlCl₃ dan AlCl₃/HCl dan Na asetat/NaOH.

Rentang serapan spektra UV-Vis dari flavonoid

Pita 2 (nm)	Pita 1 (nm)	Jenis flavonoid
250–280	310–350	Flavon
250–280	330–360	Flavonol (3-OH ter substitusi)
250–280	350–385	Isoflavon
245–275	310–330 (bahu 320 (puncak))	Isoflavon (5-deoksi-6,7- dioksidasi)
275–295	300–330	Flavanon dan dihidroflavonol
230–270	340–390	Kalkon
230–270	380–430	Auron
270–280	465–560	Antosianidin dan antosianin

Pereaksi geser yang digunakan dalam identifikasi, melarutkan senyawa dalam:

1. Metanol
2. Metanol dan ditetesi NaOH
3. Metanol dan ditetesi Natrium Asetat
4. Metanol dan ditetesi AlCl₃
5. Metanol yang ditetesi AlCl₃ yang ditetesi HCl
6. Metanol dan ditetesi Asam borat

Evaluasi

1. Uraikan cara melakukan identifikasi struktur parsial flavonoid dengan pereaksi geser menggunakan spektrofotometer UV Vis
2. Bagaimana menentukan adanya gugus karbonil hidroksi dan hidroksi karbonil?

Daftar Pustaka

Markham, K., M., Anderson, 2006, *Flavonoids*, Chemistry, Biochemistry and Application, Taylor &

Francis Group, Newyork.

Sastrohamidjojo, H., 1991, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, Yogyakarta, Hal: 28-31, 34-35.

Stahl E., 1985, *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.

PERTEMUAN 14
(PRAKTIKUM P6)
IDENTIFIKASI STRUKTUR PARSIAL FLAVONOID

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Menerapkan kemandirian, kerjasama dan komunikasi dalam kerja tim isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa melakukan identifikasi flavonoid dengan Spektrofotometer UV Vis

Bahan

Isolat flavonoid

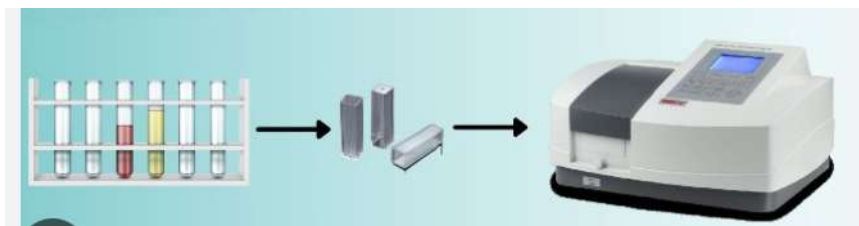
Pembanding glukosa dan fruktosa

Pembanding rutin

Pembanding quersetin

Alat

Perangkat alat spektro UV Vis (Gambar 16)



Gambar 16. Alat spektrofotometer

Cara kerja:

1. Larutan isolat flavonoid dalam metanol dimasukkan ke dalam kuvet, dengan menggunakan metanol murni sebagai blanko, kemudian rekam spektrumnya pada panjang gelombang 200-500 nm..
2. Larutan isolat flavonoid dalam metanol ditambahkan 3 tetes pereaksi NaOH 2M kemudian direkam spektranya. Untuk mengetahui apakah ada penguraian, spektrum diperiksa lagi setelah 5 menit, kemudian cuplikan dibuang, kuvet yang telah dipakai dicuci dengan aquadest.
3. Kuvet diisi kembali dengan isolat flavonoid dalam metanol ditambah 6 tetes pereaksi $AlCl_3$, dicampur, kemudian direkam spektrumnya.
4. Selanjutnya ditambah 3 tetes HCl dan spektrum direkam lagi. Cuplikan

dibuang dan kuvet dicuci.

5. Pada isolat flavonoid dalam metanol ditambah CH_3COONa , kemudian dikocok sebelum spektrum direkam.
6. Kemudian tambahkan H_3BO_3 kira-kira banyaknya setengah dari penambahan CH_3COONa , kemudian spektrum dibaca kembali.

Evaluasi

1. Bagaimana hasil spektra pita I dan II senyawa rutin dalam metanol dibanding Metanol yang ditetesi NaOH ?
2. Bagaimana hasil spektra pita I dan II senyawa rutin dalam metanol dibanding Metanol yang ditetesi AlCl_3 ?
3. Bagaimana hasil spektra pita I dan II senyawa rutin dalam metanol dibanding Metanol yang ditetesi AlCl_3 dan dalam metanol yang ditetesi AlCl_3 dan ditetesi asam klorida?

Daftar Pustaka

- Markham, K., M., Anderson, 2006, *Flavonoids*, Chemistry, Biochemistry and Application, Taylor & Francis Group, Newyork.
- Sastrohamidjojo, H., 1991, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, Yogyakarta, Hal: 28-31, 34-35.
- Stahl E., 1985, *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.

PERTEMUAN 15

REVIEW

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Menerapkan kemandirian, kerjasama dan komunikasi dalam kerja tim isolasi minyak atsiri, epms, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa melakukan diskusi dengan presentasi.

Bahan

Materi ppt dan file evaluasi antar teman

Alat

Laptop, LED, materi presentasi, dan alat tulis

Cara kerja:

1. Mahasiswa melakukan presentasi per kelompok ppt nya.
2. Kelompok lain memberikan tanggapan
3. Dilakukan penilaian antar teman
4. Review dilakukan per golongan praktikum oleh dosen praktikum.

Evaluasi

1. Apakah metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstraksi golongan senyawa minyak atsiri, alkaloid, poliketida, dan flavonoid dari tanaman yang dilakukan dalam praktikum Fitokimia ini?
2. Senyawa apakah yang diisolasi dalam praktikum isolasi dan identifikasi senyawa minyak atsiri, alkaloid, poliketida, dan flavonoid dalam praktikum fitokimia ini?
3. Bagaimana identifikasi semua senyawa dalam praktikum ini dengan KLT?

Daftar Pustaka

- Markham, K., M., Anderson, 2006, *Flavonids*, Chemistry, Biochemistry and Application, Taylor & Francis Group, Newyork.
- Sastrohamidjojo, H., 1991, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, Yogyakarta, Hal: 28-31, 34-35.
- Stahl E., 1985, *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.

PERTEMUAN 16
(RESPONSI PRAKTIKUM)

Sub Capaian Pembelajaran Mata Kuliah:

Mampu menyelesaikan masalah terkait dengan isolasi minyak atsiri, EPMS, alkaloid, poliketida, dan flavonoid

Tujuan

Mahasiswa mampu menunjukkan dan mengevaluasi proses isolasi dan identifikasinya dengan KLT.

Materi

P1 sampai P6

Model Responsi: OSCE like (kombinasi praktek dan teori)

Ada 20 pos (masing-masing pos @ 3 menit). Untuk teori berupa pilihan ganda.

Teknis responsi akan diumumkan menjelang responsi

LAMPIRAN

Penilaian praktikum
Rubrik praktikum dan kerjasama

Kriteria	80-90	70-<80	60-<70
1. Mengerjakan praktikum sesuai buku petunjuk	Mengerjakan praktikum sesuai 6 kriteria	Mengerjakan praktikum sesuai minimal 5 kriteria	Mengerjakan praktikum sesuai minimal 3 kriteria
2. Tertib dalam mengerjakan praktikum			
3. Menerapkan K3			
4. Kerjasama dalam tim baik			
5. Mandiri (tidak tergantung asisten)			
6. Menyelesaikan praktikum sesuai target/jadwal			

Rubrik Penilaian Laporan

Nilai	Kriteria	Poin penilaian
<60	Tidak memenuhi semua poin penilaian	1. Hasil praktikum ditampilkan jelas
60-64	Memenuhi 1 poin penilaian	2. Pembahasan hasil mendalam
65-69	Memenuhi 2 poin penilaian	3. Bagian-bagian laporan lengkap
70-74	Memenuhi 3 poin penilaian	4. Rapi dan sistematis
75-79	Memenuhi 4 poin penilaian	5. Tepat waktu penyerahan laporan
80-90	Memenuhi 5 poin penilaian	

Rubrik Presentasi

Score	Arti	Poin penilaian		
		30% Materi (PPT)	30% Penyampaian materi	40% Tanya jawab/Diskusi
<65	Tidak memenuhi semua kriteria	1. Tampilan menarik & kontras sesuai	1. Menguasai materi	Menjawab dengan benar
65-74	Memenuhi 1 poin penilaian	2. Jelas dan mudah dipahami	2. Disampaikan dengan vocal/artikulasi jelas	Menjawab dengan percaya diri
75-79	Memenuhi 2 poin penilaian	3. Daftar pustaka update 10 tahun dan min 6	3. Lancar dan percaya diri	3. Kerjasama baik
>80	Memenuhi 3 poin penilaian	Ditulis yang disitasi di slide		

Penilaian Praktikum

Kompetensi	4 (80-100)	3 (65-79)	2 (50-64)	1 (<50)
K3	Menggunakan APD lengkap selama praktikum	Menggunakan APD lengkap ketika praktikum tetapi tidak penuh waktu	Menggunakan APD tidak lengkap ketika praktikum tetapi tidak penuh waktu	Tidak menggunakan APD selama praktikum
Kerjasama tim	Mampu bekerjasama dengan anggota tim dengan pembagian tugas yang merata	Mampu bekerjasama dengan anggota tim dengan pembagian tugas yang tidak merata	Mampu bekerjasama dengan anggota tim dengan pembagian tugas yang tidak merata	tidak ada kerjasama tim
Teknik lab	Mampu menggunakan peralatan dengan sangat baik dan benar	Mampu menggunakan peralatan dengan cukup baik dan benar	Mampu menggunakan peralatan dengan kurang baik dan benar	Tidak mampu menggunakan peralatan dengan baik dan benar
Penggunaan Bahan	Mampu menggunakan bahan dengan sangat baik dan benar	Mampu menggunakan bahan dengan cukup baik dan benar	Mampu menggunakan bahan dengan kurang baik dan benar	Tidak mampu menggunakan peralatan dengan baik dan benar
Keberhasilan sintesis	Hasil identifikasi memenuhi 3 aspek 1: titik lebur/indeks bias 2: Organoleptis 3: identifikasi kualitatif kimiawi	Hasil identifikasi memenuhi 2 aspek 1: titik lebur/indeks bias 2: Organoleptis 3: identifikasi kualitatif kimiawi	Mengulang 1 x tanpa kendala teknis	Sintesis gagal 2 x tanpa kendala teknis

Penilaian Laporan Praktikum

No	Aspek penilaian	4 (80-100)	3 (65-79)	2 (50-64)	1 (<50)
1	Cover Komponen yang harus ada : 1) Terdapat Judul Praktikum 2) Terdapat judul percobaan 3) Terdapat tanggal percobaan 4) Terdapat tanggal pengumpulan 5) Terdapat logo UAD 6) Terdapat identitas diri 7) Terdapat identitas Laboratorium , Fakultas dan universitas	Menuliskan seluruh komponen yang diminta	Menuliskan 5-6 komponen yang diminta	Menuliskan 3-4 komponen yang diminta	Menuliskan minimal 2 komponen yang diminta
2	Tujuan Komponen yang harus ada : 1) Dituliskan dalam bentuk poin dengan angka 2) Ketepatan pemilihan tujuan praktikum	Menuliskan seluruh komponen yang diminta	Menuliskan 1 komponen yang diminta	Tidak menuliskan satupun komponen	
3	Dasar teori Komponen yang harus ada : 1) Teori yang ditulis melatar belakangi judul dan tujuan praktikum 2) Harus menuliskan sumber sitasi yang digunakan 3) Terdapat paragraph tentang struktur dan sifat fisika kimia senyawa dan bentuk sediaanya 4) Terdapat paragraph tentang metode Analisa yang mungkin digunakan 5) Terdapat paragraph tentang alasan	Menuliskan 9-10 komponen yang diminta	Menuliskan 7-8 komponen yang diminta	Menuliskan 5-6 komponen yang diminta	Menuliskan minimal 4 komponen yang diminta

	metode terpilihnya 6) Penulisan sesuai EYD 7) Alat dan Bahan 8) Terdapat spesifikasi instruemn yang digunakan 9) Terdapat spesifikasi alat yang digunakan 10) Terdapat spesifikasi/ grade bahan atau pelarut yang digunakan				
4	Cara kerja Praktikum Komponen yang harus ada : 1) Tersusun secara sistematis 2) Disajikan dalam bentuk Flow chart (diagram alir) 3) Harus menuliskan sumber sitasi yang digunakan untuk tiap tahapan cara kerjanya 4) Terdapat cara perhitungan kuantitatifnya atau rancangan analisisnya	Menuliskan seluruh komponen yang diminta	Menuliskan 3 komponen yang diminta	Menuliskan 2 komponen yang diminta	Menuliskan 1 komponen yang diminta
5	Hasil analisis Data Komponen yang harus ada : 1) Data disajikan dalam bentuk tabel / grafik 2) Terdapat satuan yang benar 3) Ketepatan dalam pemilihan rumus perhitungan 4) Ketepatan perhitungan data 5) Ketepatan pengolahan data statistika (bila ada penolakan data, LE , CV atau RSD)	Menuliskan seluruh komponen yang diminta	Menuliskan 3-4 komponen yang diminta	Menuliskan 2 komponen yang diminta	Menuliskan 1 komponen yang diminta

6	<p>Pembahasan</p> <p>Komponen yang harus ada :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Penggunaan Bahasa yang efektif dan jelas 2) Penulisan sesuai EYD 3) Pembahasan berisi tentang penjelasan hasil data praktikum dibandingkan dengan ketentuan yang berlaku (kompendia atau peraturan perundangan) 4) Alasan yang digunakan tepat dan logis 5) Jika dalam memberikan alasan melakukan sitasi, maka harus menulis sumber sitasinya 	Menuliskan seluruh komponen yang diminta	Menuliskan 3-4 komponen yang diminta	Menuliskan 2 komponen yang diminta	Menuliskan 1 komponen yang diminta
7	<p>Kesimpulan</p> <p>Komponen yang harus ada :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Mampu menjawab tujuan percobaan 2) Kesimpulan ditulis secara singkat tepat dan jelas 	Menuliskan seluruh komponen yang diminta	Menuliskan 1 komponen yang diminta	Tidak menuliskan satupun komponen	
8	<p>Daftar Pustaka:</p> <p>Mengikuti aturan penulisan Pustaka yang harus ada:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Nama penulis 2) Tahun terbit 3) Judul artikel/judul buku 4) Nama jurnal yang memuat artikel/ nama penerbit dan kota untuk buku 5) Nomor/edisi 6) Halaman yang diacu 7) Minimal 5 referensi yang digunakan 	Menuliskan seluruh komponen yang diminta	Menuliskan 5-6 komponen yang diminta	Menuliskan 3-4 komponen yang diminta	Menuliskan minimal 2 komponen yang diminta

Lampiran 1

Lampiran 2. Format Laporan Praktikum**FORMAT LAPORAN PRAKTIKUM KIMIA ORGANIK**

Sistematika laporan praktikum diatur sebagai berikut :

- I. Halaman Judul depan, Lampiran 2
- II. Tujuan percobaan
- III. Dasar teori (diambil dari buku–buku referensi atau artikel jurnal, tidak diambil dari buku petunjuk praktikum; setiap paragraf yang ditulis dicantumkan nama penulis dan tahun buku)
- IV. Metode kerja :
 - a. Alat
 - b. Bahan
 - c. Cara kerja skematis
 - d. Gambar alat
- V. Mekanisme reaksi senyawa dengan detektor.
- VI. Hasil dan perhitungan (randemen dan Rf).
- VII. Pembahasan (tidak membahas cara kerja, membahas kegunaan pereaksi, tujuan setiap tahap reaksi, prinsip kerja dan kegunaan rangkaian alat reaksi, prinsip ekstraksi, fraksinasi, serta isolasi).
- VIII. Kesimpulan (berisi hasil akhir praktikum, disajikan dengan penomoran, disesuaikan dengan tujuan).
- IX. DAFTAR PUSTAKA (disusun Alfabetis).
- X. LAMPIRAN (memuat data tambahan, misal : foto hasil reaksi, foto senyawa hasil isolasi, gambar spektrum/ gambar KLT dan laporan sementara).

NB :

- (1) I–VI : disusun dan dibawa / diupload saat pretest (sebagai laporan sementara)
VII–XI: disusun setelah praktikum (I–XI sebagai laporan resmi)
- (2) Laporan resmi dikumpulkan saat pretest untuk praktikum berikutnya
- (3) Laporan resmi ditulis tangan / diketik (sesuai dengan kesepakatan dengan Dosen pembimbing) dalam kertas HVS ukuran A4, untuk sampul depan dan form laporan dapat diketik

Lampiran 3. Contoh Sampul Depan

PRAKTIKUM FITOKIMIA

Percobaan 1

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN MINYAK ATSIRI DARI.....



Nama :
NIM :
Golongan/ kelompok :
Hari, Tanggal Praktikum :
Asisten Dosen :

Pernyataan keaslian :

Yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa laporan yang saya buat adalah hasil karya sendiri dan atau tidak memanipulasi data. Jika terbukti ada bagian yang merupakan hasil meniru karya orang lain dan atau memanipulasi data, maka saya siap menerima sanksi yang semestinya.

Yang menyatakan

(.....)

LABORATORIUM FARMAKOGNOSI FITOKIMIA

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN

2023

Lampiran 4. Contoh Halaman Isi Laporan Praktikum untuk P1

ACC Laporan Sementara
Tgl :

Percobaan 1
Judul Percobaan

- **Tujuan**
- **Dasar Teori**
- **Metode Kerja**
 - **Alat**
 - **Bahan**
 - **Cara Kerja Skematis**
- **Senyawa yang diisolasi**
- **Hasil (dibuat tabel)**

- **Pembahasan**
- **Kesimpulan**
- **Daftar Pustaka**
- **Lampiran**

Lampiran 5. Contoh Halaman Isi Laporan Praktikum untuk P2 s.d P6

Percobaan Judul Percobaan	ACC Laporan Sementara Tgl :
<ul style="list-style-type: none">· Tujuan · Dasar Teori · Metode Kerja<ul style="list-style-type: none">· Alat· Bahan· Cara Kerja Skematis· Gambar Alat · Hasil dan Pembahasana · Kesimpulan · Daftar Pustaka · Lampiran	

FM-UAD-PBM-12-04/R5