



Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Negeri Semarang

BUKU PETUNJUK PRAKTIKUM KIMIA 3



Tim Penyusun:

Jumaeri

Sri Mursiti

Triastuti Sulistyaningsih

Harjono

M. Alauhdin

PETUNJUKPRAKTIKUM KIMIA 3

Semester Genap 2021/2022



Tim Penyusun:

Jumaeri

Sri Mursiti

Triastuti Sulistyaningsih

Harjono

M. Alauhdin

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

Prakata

Praktikum Kimia 3 berisi tentang sintesis, isolasi, dan identifikasi senyawa kimia yang dibagi dalam tiga topik, yaitu sintesis aspirin, preparasi magnetit, serta isolasi metabolit sekunder. Setiap topik terdiri dari beberapa percobaan yang disesuaikan Capaian Pembelajaran Mata Kuliah.

Pada praktikum ini, mahasiswa dikenalkan dengan beberapa metode analisis instrumentasi dengan HPLC, AAS, FTIR, dan spektrofotometer UV-Vis. Jadi, senyawa atau zat hasil sintesis atau isolasi akan dianalisis dengan instrumen-instrumen analisis tersebut. Dengan demikian, setelah mengikuti praktikum ini, mahasiswa diharapkan dapat memiliki pemahaman yang komprehensif terkait suatu proses sintesis dan isolasi senyawa kimia sekaligus menganalisis atau mengkarakterisasi senyawa atau zat yang dihasilkan.

Tim penyusun mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang turut membantu dan memberikan masukan selama penyusunan buku panduan praktikum ini. Kritik, saran, dan masukan akan diterima dengan senang hati untuk menyempurnakan isi buku ini.

Semoga bermanfaat.

Semarang, Januari 2022

Tim Penyusun

Daftar Isi

Halaman Judul	i
Prakata	ii
Daftar Isi	iii
Topik 1. Sintesis Aspirin	1
Percobaan 1.1. Sintesis Aspirin	2
Percobaan 1.2. Analisis Aspirin	3
Topik 2. Preparasi Magnetit	9
Percobaan 2.1. Sintesis Magnetit	11
Percobaan 2.2. Analisis Fe hasil adsorpsi oleh Magnetit: metode kurva kalibrasi	12
Percobaan 2.3. Analisis Fe hasil adsorpsi oleh Magnetit: metode adisi standar	13
Topik 3. Isolasi Metabolit Sekunder	18
Percobaan 3.1. Ekstraksi maserasi	20
Percobaan 3.2. Uji fitokimia & KLT	20
Percobaan 3.3. Isolasi flavonoid/alkaloid/saponin	22
Percobaan 3.4. Isolasi flavonoid/alkaloid/saponin (lanjutan)	23
Percobaan 3.5. Identifikasi isolat	23

Pelaksanaan Praktikum

1. Sintesis Aspirin

Percobaan 1.1: sintesis aspirin (1x pertemuan)

Percobaan 1.2: analisis kualitatif & kuantitatif aspirin hasil sintesis dengan HPLC (1x pertemuan)

2. Preparasi Magnetit

Percobaan 2.1: sintesis magnetit (karakterisasi gugus fungsi dengan FTIR, ukuran partikel dengan PSA, dan sifat magnetic) (1x pertemuan)

Percobaan 2.2: Adsorpsi Fe oleh Magnetit (analisis: AAS dengan metode kurva kalibrasi) (1x pertemuan)

Percobaan 2.3: Adsorpsi Fe dalam sampel perairan/limbah (analisis: AAS dengan metode adisi standar) (1x pertemuan)

3. Isolasi Metabolit Sekunder (flavonoid, alkaloid, saponin – *pilih salah satu*)

Percobaan 3.1: maserasi & evaporasi (1x pertemuan)

Percobaan 3.2: uji fitokimia & KLT (1x pertemuan)

Percobaan 3.3: isolasi flavonoid/alkaloid/saponin - kromatografi kolom (2x pertemuan)

Percobaan 3.4: isolasi flavonoid/alkaloid/saponin (lanjutan) – KLT hasil krom kolom (1x pertemuan)

Percobaan 3.5: identifikasi isolat - FTIR, spektro UV (1x pertemuan)

TOPIK 1. SINTESIS ASPIRIN

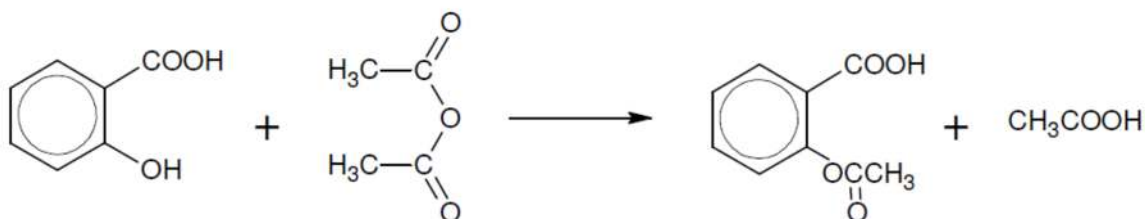
A. TUJUAN PERCOBAAN

1. Mahasiswa dapat mensintesis aspirin dari asam salisilat, melakukan pemurnian produk
2. Mahasiswa dapat menganalisis secara kualitatif dan kuantitatif aspirin hasil sintesis

B. PENDAHULUAN

Aspirin adalah nama umum untuk asam asetilsalisilat, banyak digunakan sebagai pereda demam dan sebagai pereda nyeri. Asam salisilat, yang namanya berasal dari *Salix*, famili tumbuhan willow, berasal dari ekstrak kulit pohon willow. Dalam pengobatan tradisional, teh kulit pohon willow digunakan sebagai obat sakit kepala dan tonik lainnya. Saat ini, asam salisilat diberikan dalam bentuk aspirin yang tidak terlalu mengiritasi lambung dibandingkan asam salisilat.

Untuk menyiapkan aspirin, asam salisilat direaksikan dengan anhidrida asetat berlebih. Sejumlah kecil asam kuat digunakan sebagai katalis yang mempercepat reaksi. Pada percobaan ini asam fosfat akan digunakan sebagai katalis. Asam asetat yang berlebih akan dinetralkan dengan penambahan air. Produk aspirin tidak terlalu larut dalam air sehingga produk aspirin akan mengendap saat air ditambahkan. Reaksi sintesis aspirin ditunjukkan di bawah ini:



Karena asam asetat sangat larut dalam air, asam asetat mudah dipisahkan dari produk aspirin. Aspirin yang diisolasi dalam langkah ini adalah “produk kotor”. Pemurnian dapat diperoleh melalui rekristalisasi produk kotor dalam etanol panas. Dalam percobaan ini, produk kotor akan menjadi produk yang diinginkan. Hasil persen dari produk kotor akan ditentukan untuk reaksi ini. Kemurnian produk juga akan dianalisis. Kemurnian produk dapat dianalisis dengan tiga metode berbeda: titik lebur, titrasi, dan uji spektroskopi.

Kisaran titik leleh aspirin murni adalah 138-140°C dan kisaran titik leleh bahan awal asam salisilat adalah 158-161°C. Jika kotoran terdapat dalam sampel kasar yang diperoleh dari hasil sintesis, kisaran titik leleh produk yang teramati akan lebih rendah daripada kisaran aspirin murni. Juga, kisaran titik leleh yang diperoleh mungkin lebih dari 2 derajat.

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat-alat yang digunakan

- Erlenmeyer 250 mL
- Gelas ukur 20 mL dan 100 mL
- Termometer
- Penangas air
- Pipet tetes
- Pengaduk

2. Bahan-bahan yang digunakan

- Asam salisilat
- Anhidrida asetat
- Asam sulfat pekat
- Aquades

Untuk mengkristalisasi dapat digunakan asam cuka + akuades, etanol + akuades, benzena, petroleum eter.

D. PROSEDUR PERCOBAAN

Percobaan 1.1. Sintesis Aspirin

1. Prosedur sintesis

- a. Masukkan 2 gram asam salisilat kering dan 5 mL asam asetat anhidrida ke dalam erlenmeyer 150 mL, tambahkan 5 tetes asam sulfat pekat dan goyang-goyangkan erlenmeyer agar larutan tercampur sempurna.
- b. Panaskan campuran dalam penangas air selama 10 menit, jaga suhunya pada 50 – 60°C sambil diaduk-aduk. Biarkan campuran menjadi dingin sambil sewaktu-waktu diaduk.
- c. Tambahkan 150 mL akuades, aduk baik-baik, kemudian saring dengan saringan hisap.

2. Prosedur Pemurnian

Masukkan aspirin tak murni ke dalam beaker glass 150 mL dan tambahkan 25 mL larutan NaHCO_3 jenuh. Aduklah sampai reaksi sempurna. Saring larutan dengan corong hisap. Cucilah beaker dengan 5-10 mL air.

Buatlah larutan 3,5 mL HCl pekat dan 10 mL air ke dalam beaker glass 150 mL. Tuangkan filtrat dengan hati-hati ke dalam campuran dan saring zat padat dengan menggunakan corong Buchner, cuci kristal dengan air es dingin. Tempatkan kristal pada gelas arloji dan diamkan sampai kering.

3. Prosedur Rekrystalisasi

Air tidak sesuai untuk kristalisasi, karena aspirin akan mengalami hidrolisis parsial jika dipanaskan dalam air. Larutkan kristal ke dalam benzena panas seminimal mungkin dan panaskan campuran ke dalam penangas air. Saring larutan dan diamkan sampai suhu kamar sehingga aspirin akan mengkristal.

Percobaan 1.2. Analisis Aspirin

1. Penentuan titik leleh senyawa hasil sintesis

Tabung kapiler yang telah diisi dengan hasil sintesis dimasukkan ke dalam alat melting point, kemudian dicatat suhunya pada saat mulai meleleh sampai meleleh semua. Bandingkan hasil yang diperoleh dengan nilai dari literatur (197 - 198°C).

2. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks})

a. Pembuatan larutan induk asam asetil salisilat 100 mg/L

Sebanyak 10 mg asam asetilsalisilat ditimbang dengan teliti kemudian ditambahkan pelarut asetonitril sebanyak 50 mL dalam gelas beker. Asam asetilsalisilat dan pelarut kemudian diaduk dengan pengaduk magnet hingga larut sempurna. Larutan yang dihasilkan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah asetonitril sampai tanda batas. Larutan dikocok hingga homogen.

CEK LAGI INI

b. Larutan standar asam asetil salisilat 10 mg/L (dibuat dari pengenceran larutan induk) dan aspirin hasil sintesis (dilarutkan dalam asetonitril) diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Amati spektrum yang diperoleh dan tentukan λ_{maks} .

3. Analisis aspirin hasil sintesis dengan HPLC

a. Pembuatan larutan buffer fosfat 20 mM

KH_2PO_4 sebanyak 2,7216 g dilarutkan ke dalam 1,0 L akuabides. Untuk mendapatkan pH yang sesuai (3,5-2,5), ditambahkan larutan asam ortho-fosfat secukupnya. Nilai pH diamati dengan pH meter.

b. Uji kesesuaian sistem

Larutan campuran aspirin dan asam salisilat dengan konsentrasi masing-masing 10 mg/L disiapkan dengan cara aspirin dan asam salisilat masing-masing 1 mg dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL yang telah berisi kira-kira 50 mL asetonitril. Setelah aspirin dan asam salisilat larut sempurna, asetonitril ditambahkan ke dalam labu takar sampai tanda batas. Larutan campuran aspirin dan asam salisilat tersebut diinjeksikan ke dalam sistem HPLC dengan fase gerak asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (30:70 v/v).

c. Pembuatan larutan standar

Larutan standar dibuat dengan variasi konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/L yaitu dengan memipet larutan induk asam asetilsalisilat 100 mg/L secara

berurutan sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mL. Masing-masing larutan induk hasil pemipetan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditera sampai tanda batas dengan menggunakan pelarut asetonitril. Bagian atas labu diseka, kemudian dikocok sampai homogen.

d. Preparasi sampel

Sejumlah 10 mg kristal aspirin hasil sintesis dimasukkan dalam gelas beker ukuran 100 mL. Selanjutnya ditambah pelarut asetonitril sebanyak 50 mL dan diaduk menggunakan pengaduk magnet hingga larut sempurna. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditera dengan pelarut asetonitril sampai batas. Bagian atas labu ukur diseka, kemudian dikocok hingga homogen. Tahap selanjutnya adalah penyaringan dengan kertas saring whatman 42. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Kemudian, ke dalam labu ukur tersebut ditambah pelarut asetonitril sampai tanda batas. Ujung labu ukur diseka kemudian dikocok hingga homogen.

e. Pembuatan kurva kalibrasi dan perhitungan konsentrasi aspirin hasil sintesis

Larutan standar dan sampel yang telah disiapkan dianalisis dengan HPLC menggunakan fase gerak asetonitril : buffer fosfat 20 mM pH 3,0 (30 : 70), volume injeksi 20 μ L, laju alir 1,5 mL/menit, dan detector UV-Vis pada Panjang gelombang 230 nm.

Kurva kalibrasi dibuat dari luas area vs konsentrasi. Kurva kalibrasi ini digunakan untuk menghitung konsentrasi aspirin hasil sintesis berdasarkan luas area sampel.

f. Penentuan kinerja HPLC

Kinerja pemisahan HPLC dinilai dari waktu retensi (t_R), resolusi (R_s), banyaknya plat teoritis (N), tinggi plat teoritis (HETP), factor kapasitas (k'), factor selektivitas (α), dan factor tailing. Selain itu, data kurva kalibrasi dapat pula digunakan untuk menentukan linearitas, koefisien korelasi, serta LoD dan LoQ. LoD dan LoQ dihitung dari slope dan simpangan baku (SB) kurva:

$$LOD = \frac{3 \times SB}{slope}$$
$$LOQ = \frac{3 \times SB}{slope}$$

E. PERTANYAAN DAN TUGAS

1. Apakah tujuan penambahan asam sulfat pekat pada reaksi asetilasi?
2. Penambahan air dingin bertujuan untuk menguraikan anhidrida asetat yang masih tersisa. Tulis reaksi yang terjadi?
3. Tuliskan struktur hasil samping polimer yang mungkin terbentuk dalam reaksi ini!
4. Mengapa polimer yang merupakan hasil samping, tidak larut dalam NaHCO_3 , sedangkan asam salisilat larut?
5. Jika kita menggunakan 5 gram asam salisilat dan anhidrida asetat eksek dalam sintesis aspirin di atas, berapa gram asam asetil salisilat yang dihasilkan secara teoritis?
6. Jika dipanaskan dalam air yang mendidih aspirin akan terurai menghasilkan larutan yang memberikan uji positif dengan FeCl_3 . Berikan persamaan reaksinya.
7. Bagaimana cara menentukan waktu retensi (t_R), resolusi (R_s), banyaknya plat teoritis (N), tinggi plat teoritis (HETP), factor kapasitas (k'), factor selektivitas (α), dan factor tailing.

F. LEMBAR PENGAMATAN

LEMBAR PENGAMATAN PRAKTIKUM SINTESIS ASPIRIN

Nama Mahasiswa :

Kelompok :

Tanggal :

A. Data penggunaan bahan

	Berat Molekul	Berat Jenis	Massa/Volume	Jumlah Mol
Asam salisilat				
Anhidrida asetat				
Asam sulfat pekat				
Asam asetat				
NaHCO ₃				

B. Reaksi Kimia

C. Pengamatan

1. Sintesis aspirin

2. Pemurnian aspirin

3. Rekristalisasi aspirin

D. Hasil Sintesis

Penampilan Fisik produk: _____

Kisaran suhu leleh ($^{\circ}$ C): _____

Massa aspirin yang diperoleh: _____

Jumlah mol aspirin yang diperoleh: _____

Jumlah mol asam salisilat yang digunakan (reagen pembatas): ____ mol

Persentase hasil reaksi: _____

Panjang gelombang maksimum: _____

Analisis dengan HPLC:

Konsentrasi larutan standar (ppm)	Waktu retensi (menit)	Luas area
0		
2		
4		
6		
8		
10		
Sampel hasil sintesis		

Persamaan garis lurus:

Linearitas:

Konsentrasi aspirin hasil sintesis:

Kinerja HPLC

Parameter	Aspirin	Asam salisilat
Waktu retensi (menit)		
Resolusi		
Jumlah plat		
Tinggi plat (mm)		
Factor kapasitas		
Factor selektivitas		
LoD (ppm)		
LoQ (ppm)		

E. Simpulan

TOPIK 2. PREPARASI MAGNETIT

A. TUJUAN PERCOBAAN

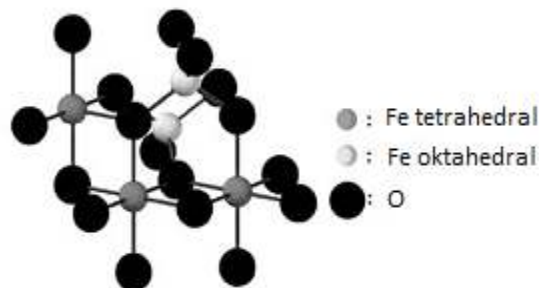
1. Mempelajari proses pembuatan magnetit menggunakan energi rendah dan energi tinggi serta mengkarakterisasi senyawa yang dihasilkan dengan FTIR.
2. Mempelajari proses adsorpsi ion logam oleh magnetit
3. Menentukan konsentrasi ion logam dengan AAS menggunakan metode kurva kalibrasi dan adisi standar

B. PENDAHULUAN

1. Magnetit

Magnetit sangat menarik untuk dipelajari karena sifat fisiko-kimiawinya yang memungkinkannya digunakan dalam domain yang sangat berbeda. magnetit dapat digunakan untuk pemurnian air, penyimpanan energi panas atau untuk mendapatkan fluida magnetik [1-6]. magnetit juga memiliki aplikasi di bidang medis seperti pencitraan resonansi magnetik, terapi hipertermal tumor ganas atau pengiriman obat di jaringan dengan lokasi yang tepat [7-10].

Magnetit (Fe_3O_4) adalah campuran oksida besi ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$). Oleh karena mengandung dua spesies besi yaitu ferro (tereduksi) dan ferri (teroksidasi), magnetit seringkali disebut dengan besi(II)(III) oksida. Struktur kristal ketiga oksida besi dapat digambarkan dalam bentuk bidang pengemasan rapat anion oksigen dengan kation-kation besi dalam situs oktahedral atau tetrahedral. Pada magnetit, ion-ion oksigen berada dalam penyusunan *cubic close-packed*. Magnetit mempunyai struktur *spinel* terbalik dengan ion-ion Fe(III) terdistribusi secara acak antara situs oktahedral dan tetrahedral dan ion-ion Fe(II) dalam situs oktahedral (Gambar 1). Dalam struktur tersebut, setengah dari ion Fe^{3+} berkoordinasi secara tetrahedral sedangkan setengah ion Fe^{3+} yang lain dan semua ion Fe^{2+} berkoordinasi secara oktahedral. Setiap situs oktahedral memiliki 6 ion O^{2-} sebagai atom tetangga terdekat yang tertata pada ujung oktahedron, sedangkan pada situs tetrahedral memiliki 4 ion O^{2-} sebagai atom tetangga terdekat yang tertata pada ujung tetrahedron [11].



Gambar 1. Struktur kristal magnetit, Fe_3O_4 (Teja dan Koh, 2009)

2. Spektroskopi Serapan Atom

Bila suatu berkas sinar (radiasi elektromagnetik) berinteraksi dengan materi maka sinar tersebut akan mengalami beberapa kemungkinan, yaitu sinar tersebut sebagian diteruskan (emisi), diserap (absorpsi), dipendarkan (fluoresensi) atau dihamburkan (*scattering*). Metode analisis kimia yang didasarkan atas pengukuran banyaknya radiasi elektromagnetik yang diserap oleh materi disebut metode spektroskopi absorpsi. Jika materi yang menyerap radiasi elektromagnetik tersebut adalah berupa atom maka metode tersebut secara spesifik disebut spektroskopi serapan atom atau *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS).

Suatu atom/molekul akan menyerap radiasi elektromagnetik dengan energi yang spesifik sesuai dengan persamaan Planck $E = h \cdot \nu$, dengan E adalah energi foton, ν frekuensi dan h adalah tetapan Planck. Suatu foton memiliki energi tertentu dan dapat menyebabkan transisi tingkat energi suatu atom/molekul. Metode AAS berprinsip pada absorpsi radiasi elektromagnetik oleh atom. Atom-atom akan menyerap radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang tertentu dan spesifik, tergantung pada sifat unsurnya. Dengan absorpsi energi tersebut, atom-atom bebas yang berada dalam keadaan dasar (*ground state*) akan mengalami eksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi (*excitation state*) yang kemudian akan kembali lagi ke keadaan dasar sambil memancarkan radiasi.

Dalam analisis dengan AAS berlaku hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa banyaknya sinar yang diserap oleh suatu materi/atom berbanding langsung dengan konsentrasinya.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A = absorbansi (banyaknya sinar yang diserap oleh atom)

ϵ = koefisien ekstingsi molar ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)

b = tebal media penyerap/ kuvet (cm)

c = konsentrasi sampel (M)

AAS dapat digunakan dalam penentuan kadar ion logam suatu sampel larutan. Pengukuran dapat dilakukan dengan metode kurva kalibrasi ataupun dengan metode adisi standar.

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat-alat yang dipergunakan

- Peralatan gelas
- Hot plate
- Neraca analitik
- Kertas pH indikator universal
- Oven

- Desikator
 - *Ultrasonic batch*
 - Magnet eksternal
 - Penyaring vakum
 - *particle size analyser* (PSA)
 - Spektroskopi serapan atom
2. Bahan-bahan yang dipergunakan
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - Larutan baku Fe 1000 ppm
 - HNO_3
 - NaOH
 - KBr
 - Akuades
 - Kertas saring whatman 42
 - Sampel air sungai/air limbah

D. PROSEDUR PERCOBAAN

1. Percobaan 2.1. Sintesis Magnetit

- a) Sintesis Magnetit, Fe_3O_4 secara mekanik (energi rendah)
 Sebanyak 1,39 g (0,005 mol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 2,70 g (0,010 mol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ masing-masing dilarutkan dalam 10 mL aquabides. Keduanya kemudian dicampur dan diletakkan pada *magnetic stirrer hot plate*. Campuran larutan ini kemudian ditambah secara bertetes-tetes larutan NaOH 1,5 M pada suhu 50 °C sambil diaduk hingga pH mencapai pH 12. Selanjutnya endapan disaring dengan kertas saring Whatman 42 dan dicuci hingga pH netral. Endapan dikeringkan pada suhu 65 °C selama 1 jam.
- b) Sintesis Magnetit, Fe_3O_4 secara ultrasonik (energi tinggi)
 Sebanyak 1,39 g (0,005 mol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 2,70 g (0,010 mol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ masing-masing dilarutkan dalam 10 mL aquabides. Keduanya kemudian dicampur dan diletakkan pada *ultrasonic batch*. Campuran larutan ini kemudian ditambah larutan NaOH 1,5 M secara bertetes-tetes pada suhu 50 °C tanpa diaduk hingga pH mencapai pH 12. Selanjutnya endapan disaring dengan kertas saring Whatman 42 dan dicuci hingga pH netral. Endapan dikeringkan pada suhu 65 °C selama 1 jam.
- c) Karakterisasi Magnetit

- Padatan magnetit hasil sintesis dikarakterisasi gugus fungsionalnya menggunakan spektrofotometer inframerah (FTIR), dan sifat magnetiknya menggunakan magnet eksternal.
- Lakukan pengukuran distribusi ukuran partikel yang diperoleh dengan menggunakan *particle size analyser* (PSA)

2. Percobaan 2.2. Adsorpsi besi oleh Magnetit

Magnetit yang telah disintesis dan dikarakterisasi digunakan sebagai adsorben logam Fe. Adsorpsi dilakukan pada beberapa kondisi pH dan waktu kontak yang berbeda.

a) Pembuatan larutan stok Fe

Larutan stok Fe 100 ppm dibuat dengan cara mengencerkan 10 mL larutan baku Fe 1000 ppm dengan aquades dalam labu ukur 100 mL.

b) Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan standar Fe 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm disiapkan dengan cara mengambil 5 buah labu takar 10 mL, masing-masing diisi 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, dan 5 mL larutan Fe 100 ppm, kemudian ditambah aquades sampai tanda batas lalu dikocok hingga homogen. Absorbansi larutan standar ini kemudian diukur dengan SSA. Data hasil pengukuran digunakan untuk membuat kurva kalibrasi dengan konsentrasi sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y.

c) Optimasi pH

Larutan Fe 5 ppm sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer dengan pH yang berbeda yaitu 5, 6, 7, 8, dan 9. pH diatur dengan cara menambahkan HNO_3 untuk suasana asam dan NH_3 untuk suasana basa. Setelah itu, sebanyak 0,01 gram magnetit yang sudah disintesis dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer. Kemudian masing-masing larutan dikocok menggunakan orbital shaker dengan kecepatan 200 rpm selama 60 menit. Setelah itu adsorben dipisahkan menggunakan magnet eksternal. Larutan diukur absorbansinya dengan SSA untuk menentukan kadar besi dalam larutan setelah adsorpsi.

d) Optimasi waktu kontak

Tujuh buah Erlenmeyer masing-masing diisi dengan 10 mL larutan Fe 5 ppm dengan pH tertentu (optimum). Setelah itu, sebanyak 0,01 gram magnetit yang sudah disintesis dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer. Kemudian masing-masing larutan dikocok menggunakan orbital shaker dengan kecepatan 200 rpm selama 10, 20, 30, 40, 50, 60 dan 120 menit. Setelah itu adsorben dipisahkan menggunakan magnet eksternal. Larutan

diukur absorbansinya dengan SSA untuk menentukan kadar besi dalam larutan setelah adsorpsi.

3. Percobaan 2.3: Adsorpsi besi dalam sampel perairan

a) Adsorpsi ion logam dalam sampel

Sampel dari perairan disaring dengan kertas saring lalu diatur pH-nya sehingga berada pada pH optimum adsorpsi. Setelah itu, 20 mL larutan sampel hasil penyaringan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 0,02 gram magnetit yang sudah disintesis. Kemudian, larutan dikocok menggunakan orbital shaker dengan kecepatan 200 rpm selama waktu optimum. Setelah itu adsorben dipisahkan dari larutan menggunakan magnet eksternal. Ukur adsorbansi filtrat menggunakan SSA

b) Penentuan besi secara adisi standar

Larutan hasil adsorpsi kemudian dimasukkan ke dalam lima buah labu takar 10 mL masing-masing 2 mL. Ke dalam setiap labu takar ditambah larutan HNO_3 1 M sebanyak 1 mL. Kemudian secara berurutan, larutan standar Fe 10 ppm ditambahkan sebanyak 0; 1; 2; 3; dan 4 mL ke dalam setiap labu takar, lalu encerkan dengan akuades sampai tanda batas. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan SSA, lalu dibuat kurva hubungan konsentrasi atau volume larutan standar yang ditambahkan dengan absorbansi hasil pengukuran. Kadar besi dalam sampel dihitung dari kurva tersebut.

E. PERTANYAAN DAN TUGAS

1. Jelaskan reaksi pembentukan magnetit pada metoda yang dilakukan.
2. Jelaskan manakah hasil pekerjaan yang lebih baik dari kedua metoda pembuatan magnetit yang dilakukan!
3. Jelaskan prinsip dasar spektrofotometer FTIR dan PSA.
4. Jelaskan prinsip dasar pengukuran dengan SSA
5. Apakah perbedaan metode kurva kalibrasi dan metode adisi standar pada pengukuran dengan SSA

F. DAFTAR PUSTAKA

1. M. Namdeo Magnetite Nanoparticles as Effective Adsorbent for Water Purification- A Review Adv Recycling Waste Manag, 2 (2017) 1-13; DOI: 10.4172/2475-7675.1000135
2. A. Mirzaei, Z. Chen, F. Haghghat, L. Yerushalmi Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogonous Fenton-type processes - A review, Chemosphere 174 (2017) 665 – 688.

3. M. Munoz, Z.M. de Pedro, J.A. Casas, J.J. Rodriguez Preparation of magnetite-based catalysts and their application in heterogeneous Fenton oxidation – A review, *Applied Catalysis B: Environmental* 176–177 (2015) 249–265.
4. A.K. Rathi, R. Zboril, R.S. Varma, M.B. Gawande Magnetite (Ferrites)-Supported Nano-Catalysts: Sustainable Applications in Organic Transformations, *ACS Symposium Series*, vol. 1238 (2016), *Ferrites and Ferrates: Chemistry and Applications in Sustainable Energy and Environmental Remediation*, Chapter 2, 39-78.
5. Y. Grosu, A. Faik, I. Ortega-Fernández, B. D'Aguanno, Natural Magnetite for thermal energy storage: Excellent thermophysical properties, reversible latent heat transition and controlled thermal conductivity, *SOL. ENERG. MAT. SOL. C.*, 161, (2017) 170-176.
6. S.I. Evdokimov, V.S. Evdokimov, Synthesis of a stable magnetite (magnetic fluid) colloid solution, *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng.*, 164 (2017) 012013, doi:10.1088/1757-899X/164/1/012013.
7. Zachary R. Stephen, Forrest M. Kievit, Miqin Zhang, Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging, *Mater Today (Kidlington)*, 14 (2011) 330–338.
8. R. Tietze, J. Zaloga, H. Unterweger, S. Lyer, Ralf, P. Friedrich, C. Janko, M. Pöttler, S. Dürr, C. Alexiou, Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468, (2015), 463-470.
9. C.S.S.R. Kumar, F. Mohammad, Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (2011) 789-808.
10. M. Bañobre-López, A. Teijeiro, J. Rivas, Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment, *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 18, (2013) 397-400.
11. Yan, H., Zhang, J., You, C., Song, Z., Yu, B., Shen, Y., Influences of different synthesis conditions on properties of Fe₃O₄ nanoparticles, *Materials Chemistry and Physics.*, (2009) ,113, 46-52.

G. LEMBAR PENGAMATAN

LEMBAR PENGAMATAN PRAKTIKUM PREPARASI MAGNETIT

Nama Mahasiswa :

Kelompok :

Tanggal :

1) Data penggunaan bahan

Data bahan dibuat untuk 1 kegiatan

Bahan	Berat Molekul	Berat Jenis/kemurnian	Massa/Volume	Jumlah Mol

2) Pengamatan

Percobaan 2.1.

1. Sintesis Magnetit, Fe_3O_4 secara mekanik (energi rendah)

- Membuat larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Massa kristal:
Warna larutan:
- Membuat larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Massa kristal:
Warna larutan:
- Reaksi antara FeSO_4 dengan FeCl_3 Warna larutan:
pH campuran:
Reaksi
- Penambahan NaOH 1.5 M pada saat proses pemanasan Temperatur hot plate:
Temperatur awal campuran:
pH campuran:
- Penyaringan dan pencucian dengan aquades pH larutan:
- Pengovenan Temperatur:
Waktu:
Massa kristal:

2. Sintesis Magnetit, Fe_3O_4 secara ultrasonik (energi tinggi)

- a. Membuat larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Massa kristal:
Warna larutan:
- b. Membuat larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Massa kristal:
Warna larutan:
- c. Reaksi antara FeSO_4 dengan FeCl_3 Warna larutan:
pH campuran:
Reaksi
- d. Penambahan NaOH 1.5 M pada saat proses pemanasan Temperatur hot plate:
Temperatur awal campuran:
pH campuran:
- e. Penyaringan dan pencucian dengan aquades pH larutan:
- f. Pengovenan Temperatur:
Waktu:
Massa kristal:

3. Hasil (data) pembuatan magnetit :

- a. Massa, warna Fe_3O_4 dan sifat kemagnetan produk
- b. spektra IR senyawa hasil dari kedua metoda
- c. Distribusi ukuran partikel yang diukur dengan Particle Size Analyser.

Percobaan 2.2.

1. Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan standar (ppm)	Volume larutan induk (mL)	Volume akhir (mL)	Absorbansi
0,0	0,0	10	
1,0	1,0	10	
2,0	2,0	10	
3,0	3,0	10	
4,0	4,0	10	
5,0	5,0	10	

2. Optimasi pH

pH	Absorbansi	Fe sisa (ppm)	Fe teradsorp (ppm)	Kapasitas adsorpsi (mg/g)
4				
5				
6				

8				
9				

3. Optimasi waktu kontak

Waktu (menit)	Absorbansi	Fe sisa (ppm)	Fe teradsorp (ppm)	Kapasitas adsorpsi (mg/g)
10				
30				
50				
70				
90				
120				

Percobaan 2.3,

1. Adsorpsi Fe dalam sampel perairan

Sumber sampel :

Karakteristik sampel: (pH awal, warna, dll)

Massa adsorben :

2. Adisi standar

Larutan stok (mL)	HNO ₃ 1 M (mL)	Sampel (mL)	Volume akhir (mL)	Absorbansi
0	1	2	10	
1	1	2	10	
2	1	2	10	
3	1	2	10	
4	1	2	10	

H. Simpulan

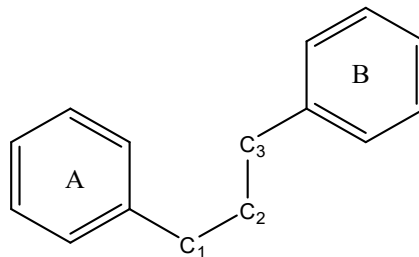
TOPIK 3A. ISOLASI SENYAWA FLAVONOID

A. TUJUAN PERCOBAAN

Mahasiswa dapat mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa flavonoid dari bagian tumbuhan.

B. PENDAHULUAN

Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mempunyai struktur C₆-C₃-C₆. Tiap bagian C₆ merupakan cincin benzen yang terdistribusi dan dihubungkan oleh atom C₃ seperti ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Umum Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar dan terdapat dalam semua tumbuhan hijau. Golongan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian melindungi membran lipid terhadap reaksi yang merusak.

Aktivitas antioksidannya menyebabkan flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional. Manfaat lain dari flavonoid yaitu dapat melindungi struktur dari sel, mampu meningkatkan efektivitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos pada tulang dan sebagai antibiotik. Senyawa flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan tinggi seperti pada daun, bunga, biji, dan kulit kayu.

Flavonoid merupakan senyawa polar sehingga dapat diisolasi menggunakan pelarut polar, antara lain etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), dan air.

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat-alat yang digunakan

- Labu Erlenmeyer 150 mL
- Kertas saring
- Beaker glass 50 mL
- Labu hisap
- Chamber KLT
- Plat KLT
- Corong Büchner
- Pengaduk kaca
- Neraca
- alat evaporator Buchii
- Lampu UV λ 254 nm dan λ 366 nm (Camag UV-Cabinet II)
- Spektrometer Infra Red Shimadzu FTIR 8201
- Kromatografi gas (GC) Hewlett Packard 5890 series II
- Spatula
- Mortar
- Oven
- Termometer
- Desikator
- Kolom kromatografi
- Alat ukur Melting-point (opsional)

2. Bahan-bahan yang dipergunakan

- Bagian tumbuhan (Biji mahoni, Buah mahkota dewa, Daun kelor, Daun binahong, Daun sirih hijau, Daun sirih merah, dll) – pilih salah satu
- n-Heksana
- Etanol
- Etil asetat
- Larutan HCl 10%
- Larutan NaOH 2%
- Logam Mg
- Larutan H₂SO₄ 10%
- Larutan AlCl₃ 10%
- Anhidrida asam asetat
- Reagen Dragendorff
- Reagen Mayer
- Aquades
- Silika gel Merck 60 (60-70 mesh)
- Merck Kieselgel 60 GF254 0,25 mm
- Larutan CeSO₄ dalam H₂SO₄ encer 0,056%

D. PROSEDUR PERCOBAAN

Percobaan 3.1. Penyiapan Sampel.

1. Biji mahoni (atau bahan alam lain) dibersihkan, dikeringkan, dan dihaluskan sehingga membentuk serbuk halus.
2. Sebanyak 1000 g serbuk dimaserasi dengan n-heksana selama 3x24 jam untuk mengambil senyawa non polar. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan pengurangan tekanan menggunakan evaporator Buchii sampai semua pelarut habis dan diperoleh minyak. Amati dan catat warna ekstrak, lalu hitung volume, massa jenis, dan rendemen ekstrak. Massa jenis ditentukan dengan piknometer.
3. Ampas bebas minyak dimaserasi dengan etanol selama 3 x 24 jam untuk mengambil senyawa semi polar dan polar yang terdapat di dalamnya. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan pengurangan tekanan menggunakan evaporator Buchii hingga diperoleh ekstrak etanol yang sudah kering. Amati dan catat warna ekstrak, lalu hitung massa, titik leleh, dan rendemen ekstrak.

Percobaan 3.2. Uji Fitokimia dan KLT

1. Minyak dan ekstrak etanol yang diperoleh pada Percobaan 3.1. ditambah pereaksi untuk uji fitokimia yaitu mengidentifikasi adanya senyawa metabolit sekunder, seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

Metabolit sekunder	Pereaksi	Pengamatan
Alkaloid	Dragendorff	Endapan jingga
Alkaloid	Mayer	Endapan putih
Flavonoid	Larutan HCl + serbuk Mg	Merah jingga/merah ungu
Saponin	Air	Buih stabil selama 5 menit
Steroid	Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄	Hijau biru
Terpenoid	Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄	Merah/ungu

a. Identifikasi alkaloid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan HCl 2 N sebanyak 1 mL dan aquades sebanyak 6 mL. Campuran dipanaskan selama 2 menit. Setelah itu, didinginkan dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat sebanyak 4 mL direaksikan dengan 1 mL pereaksi Dragendorff atau pereaksi Mayer. Pada pereaksi Mayer, keberadaan alkaloid

akan ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau krem, sedangkan pada pereaksi Dragendorff, adanya alkaloid ditunjukkan dengan munculnya endapan berwarna jingga.

Pereaksi Mayer terdiri dari larutan pertama (1,36 g HgCl₂ + 60 ml akuades) dan larutan kedua (5 g KI + 10 ml akuades). Larutan pertama dituangkan ke dalam larutan yang kedua, lalu diencerkan dengan akuades sampai batas 100 ml dalam labu takar.

Pereaksi Dragendorff: Sebanyak 8 g KI dilarutkan dalam 20 mL akuades, sedangkan pada bagian yang lain dilarutkan 0,85 g bismut subnitrat dalam 10 mL asam asetat glasial dan 40 mL akuades. Kedua larutan ini kemudian dicampurkan, lalu disimpan dalam botol berwarna coklat.

b. Identifikasi Flavanoid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, campuran disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah sedikit serbuk Mg serta larutan HCl 10% sebanyak 1 mL. Tanda bahwa sampel positif mengandung flavonoid yaitu terbentuknya warna merah, jingga atau kuning.

c. Identifikasi saponin

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas. Setelah itu, ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Tanda bahwa sampel positif mengandung saponin yaitu terbentuknya busa permanen selama 5 menit.

d. Identifikasi steroid dan terpenoid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Tanda bahwa sampel positif mengandung steroid yaitu menghasilkan warna hijau atau biru, sedangkan positif terpenoid yaitu menghasilkan warna merah atau ungu. Pereaksi Liebermann-Burchard dibuat dengan mencampurkan 5 mL anhidrida asam asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dalam 50 mL etanol absolut.

2. Jika dalam ekstrak etanol terdapat senyawa flavonoid, maka kemudian dilakukan prosedur isolasi khusus untuk senyawa flavonoid sebagai berikut.

Sebanyak 10 g ekstrak etanol yang sudah kering dimasukkan dalam gelas kimia, ditambah 100 mL aquades dan 100 mL etil asetat, dan diaduk hingga semua ekstrak larut. Campuran dimasukkan ke dalam corong pisah 250 ml dan dikocok sampai homogen kemudian didiamkan sampai terbentuk dua fase. Fase etil asetat diambil, dan dievaporasi dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kering flavonoid kasar.

3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mencari eluen yang sesuai pada saat kromatografi kolom. Prosedurnya adalah sebagai berikut.

- 1) Siapkan plat KLT silika GF₂₅₄ dengan ukuran p x l = 10 cm x 2 cm.
- 2) Beri garis dengan pensil secara hati-hati (jangan sampai silika plat KLT tergores), dengan jarak $\frac{1}{2}$ cm dari bawah dan atas plat sebagai batas elusi.
- 3) Siapkan eluen yaitu n-Heksana:Etil asetat (3:2), Metanol:Etil asetat (4:1), Metanol:Etil asetat (3:2), masing-masing sebanyak 10 mL
- 4) Masukkan masing-masing eluen ke dalam chamber.
- 5) Tutup chamber dan biarkan chamber jenuh dengan uap eluen.
- 6) Larutkan sejumlah sampel ekstrak etanol ke dalam etanol.
- 7) Totolkan secara hati-hati larutan sampel pada plat KLT sesuai batas bawah yang telah dibuat. Tunggu sampai totolan pertama kering, kemudian totolkan lagi. Lakukan beberapa kali penotolan sampai sampel dirasa cukup untuk dielusikan.
- 8) Masukkan plat KLT ke dalam chamber, tutup, dan elusikan sampai batas atas yang telah dibuat.
- 9) Setelah mencapai batas atas, elusi dihentikan dengan cara mengambil plat KLT. Angin-anginkan hingga kering.
- 10) Lihat di bawah lampu UV.
- 11) Jika noda tidak terlihat, maka plat KLT dapat disemprot dengan penampak noda yaitu larutan CeSO₄ dalam H₂SO₄ encer 0,056%, kemudian dioven pada suhu 50 °C selama 10 menit hingga muncul noda hitam.
- 12) Beri tanda dengan pensil secara hati-hati pada noda yang terlihat.
- 13) Hitung harga R_f masing-masing noda.
- 14) Lakukan dengan berbagai perbandingan eluen hingga pemisahan berjalan baik, yaitu R_f = 0,3 – 0,7.
- 15) Jika pemisahan pada klt sudah baik, maka eluen yang digunakan pada KLT dapat digunakan pada kromatografi kolom.

Percobaan 3.3. Isolasi 1: Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

- 1) Timbang silika gel sebanyak 100 g.
- 2) Silika gel dioven pada suhu 120 °C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator.
- 3) Silika gel ditambah 100 mL n-Heksana, aduk hingga menjadi bubur silika.
- 4) Masukkan bubur silika ke dalam kolom kromatografi.
- 5) Kolom silika dibiarkan 1 x 24 jam (bisa sambil diketuk-ketuk) hingga mampat dan tidak ada gelembung udara di dalam kolom silika.

- 6) Timbang sampel ekstrak etanol sebanyak 10 gram, impregnasi pada 10 gram silica gel (ekstrak dicampur dengan silica gel kemudian digerus dengan mortar hingga homogen).
- 7) Letakkan kertas saring di atas bubuk silica dalam kolom sebagai alas sampel.
- 8) Masukkan sampel ke dalam kolom silica secara merata di permukaan kertas saring.
- 9) Elusikan secara pelan-pelan dengan eluen yang sesuai.
- 10) Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol vial setiap 5 mL.
- 11) Tambahkan eluen secara berkala dan meningkat kepolarannya/gradient setiap kali eluen di dalam kolom mulai berkurang (dijaga agar kolom silica selalu tertutup oleh eluen).
- 12) Sesekali dicek dengan cara menotolkan sedikit fraksi di plat KLT dan dilihat di bawah lampu UV. Jika masih terdapat noda, maka berarti masih terdapat komponen senyawa di dalam sampel yang dielusi.
- 13) Setelah elusi dirasa cukup (tidak ada lagi noda dalam fraksi dari kolom silica), maka elusi dihentikan.

Percobaan 3.4. Isolasi 2: KLT hasil Kromatografi Kolom

- 1) Semua fraksi yang diperoleh dari Percobaan 3.3. dilakukan KLT secara bersamaan dalam 1 plat KLT.
- 2) Proses KLT mengikuti prosedur pada Percobaan 3.2. dengan menggunakan eluen yang sesuai.
- 3) Fraksi-fraksi yang memiliki noda dengan harga R_f yang hampir sama, kemudian dijadikan satu dan dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kering flavonoid murni.

Percobaan 3.5. Identifikasi isolat

1. Uji flavonoid dengan reagen

Isolat dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, campuran disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah sedikit serbuk Mg serta larutan HCl 10% sebanyak 1 mL. Isolat yang mengandung flavonoid akan memunculkan warna merah, jingga atau kuning

2. Identifikasi gugus fungsi dengan FTIR

- a. Sebanyak 2 mg dicampur dengan 100 mg serbuk kering KBr dan ditumbuk halus. Campuran tersebut dimampatkan dalam cetakan menggunakan pompa hidrolik
- b. sehingga membentuk kepingan tipis (pelet). Karakterisasi terhadap kepingan sampel dilakukan dengan spektrofotometer FTIR.

3. Identifikasi serapan UV-Vis

Sampel sebanyak 2 mg dilarutkan dalam etanol pada labu ukur 10 ml. Larutan sampel dimasukkan ke dalam kuvet, diinkubasi selama 30 menit dan dianalisis pada panjang gelombang 200-600 nm. Analisis juga dilakukan dengan menambahkan pereaksi geser, yaitu larutan NaOH 2% sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur.

E. PERTANYAAN DAN TUGAS

1. Pada isolasi senyawa bahan alam, perlu dilakukan maserasi menggunakan n-Heksana terlebih dahulu sebelum maserasi menggunakan etanol. Apakah tujuannya?
2. Chamber KLT sebelum digunakan untuk elusi harus jenuh dengan uap eluen. Mengapa harus demikian?
3. Mengapa pada kolom silika tidak diperbolehkan adanya gelembung udara?
4. Apa gunanya pereaksi geser pada identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis?
5. Tuliskan reaksi yang terjadi antara pereaksi dengan senyawa flavonoid hingga diperoleh warna merah jingga atau merah ungu!
6. Jika dapat diramalkan, maka gugus-gugus fungsi apa sajakah yang akan muncul di dalam spektrum IR senyawa flavonoid?

F. DAFTAR PUSTAKA

- Feliana, K., Mursiti, S., and Harjono. 2018. Isolasi dan Elusidasi Senyawa Flavonoid dari Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.), *Indonesian Journal of Chemical Science*, 7(2): 153-159.
- Mursiti, S., 2015. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Antihiperlikemik dari Biji Mahoni (*Swieteniamacrophylla*, King). *Disertasi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Mursiti, S., 2017, Isolation and Antimicrobial Activity of Flavonoid Compounds from Mahagony Seeds (*Swietenia macrophylla*, King), *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 172(1): 012055.
- Nugraha, A.C., Prasetya A.T., and Mursiti, S., 2017, Isolasi, identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid sebagai Antibakteri dari Daun Mangga, *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2): 91-96.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., and Engel, R.G., 1988, *Introduction to Organic Laboratory Techniques - Small-Scale Approach*, 1st Ed., Harcourt Brace: Florida.

Qomariyah, E., Mabruroh, Mursiti, S., and Kusumo, E., 2019, .), Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Murbei (*Morus alba* Linn) Indonesian Journal of Chemical Science, 8(1): 16-22.

G. LEMBAR PENGAMATAN

LEMBAR PENGAMATAN PRAKTIKUM (ISOLASI SENYAWA FLAVONOID)

Nama Mahasiswa :

Kelompok :

Tanggal :

A. Hasil Maserasi dengan n-Heksana

Berat bahan (g)	Volume ekstrak (mL)	Warna	Massa jenis (g/mL)	Rendemen (%)

B. Hasil Maserasi dengan Etanol

Berat bahan (g)	Berat ekstrak (g)	Warna	Titik leleh (°C)	Rendemen (%)

C. Uji Fitokimia

Pereaksi	Pengamatan		Kesimpulan	
	Minyak	Ekstrak etanol	Minyak	Ekstrak etanol
Dragendorff				
Mayer				
HCl + Mg				
Air				
Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄				
Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄				

D. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Awal

Sampel: ekstrak kering flavonoid kasar

eluen	Noda	R _f
n-Heksana: Etil asetat (3:2)	1	
	2	
	3	

	
Metanol:Etil asetat (4:1)	1	
	2	
	
Metanol:Etil asetat (3:2)	1	
	2	
	
....		

E. Hasil Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Sampel: ekstrak kering flavonoid kasar

Eluen:

Nomor Vial	Warna
1	
2	
3	
....	

F. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi KKG

Sampel: fraksi hasil KKG

Eluen:

Nomor Vial	Noda	R _f
1	1	
	2	
	
2	1	
	2	
	
....		

G. Hasil Identifikasi Isolat

Titik leleh:

Identifikasi dengan reagen

Reagen	Pengamatan	Hasil
Mg + HCl 10%		

Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis

Sampel	λ_{maks} (nm)
Isolat	
Isolat + reagen geser	

Identifikasi dengan spektrofotometer infra merah

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus fungsi

H. Simpulan

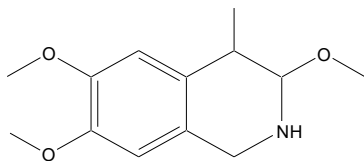
TOPIK 3B. ISOLASI SENYAWA ALKALOID

A. TUJUAN PERCOBAAN

Mahasiswa dapat mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa alkaloid dari bagian tumbuhan.

B. PENDAHULUAN

Alkaloid adalah senyawa dari tumbuh-tumbuhan yang terjadi secara alamiah, mempunyai sifat basa dan paling tidak mengandung satu atom nitrogen yang membentuk bagian dari suatu sistem siklik. Alkaloid adalah suatu amina yang digunakan sebagai obat-obatan yang berasal dari kulit kayu, akar, daun, bunga, buah, maupun biji tumbuh-tumbuhan yang secara umum mirip alkali. Hal ini disebabkan karena amina yang mempunyai sifat fisiologi yang aktif ini dapat dinetralkan dengan asam. Alkaloid terdiri atas atom karbon, hidrogen, dan nitrogen, sebagian besar diantaranya mengandung oksigen, dan sesuai dengan namanya mirip dengan alkali. Satu contoh struktur senyawa alkaloid tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur alkaloid Swietenindonesin-2

Alkaloid terdapat di dalam tumbuhan pada bagian sel yang aktif seperti daun, akar, kayu, dan biji. Pengujian alkaloid secara sederhana tetapi sama sekali tidak sempurna, dalam daun atau buah yang segar adalah terasa pahit bila dirasakan dengan lidah, namun ketentuan ini tidak mutlak, karena ada juga alkaloid yang tidak berasa seperti piperina yang berasal dari lada hitam. Kegunaan alkaloid dalam bidang kesehatan antara lain adalah memacu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, menurunkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit, dan melawan infeksi mikroba.

Berbagai macam cara dilakukan untuk mendeteksi alkaloid di dalam jaringan tumbuhan. Senyawa yang bersifat non polar dihilangkan terlebih dahulu dari tumbuh-tumbuhan dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut non polar. Setelah itu berbagai prosedur untuk mendapatkan alkaloid dapat digunakan. Jaringan tumbuh-tumbuhan dapat diekstrak dengan air, etanol, atau metanol, dengan campuran alkohol encer yang sudah diasamkan.

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat-alat yang digunakan

- Labu Erlenmeyer 150 mL
- Kertas saring
- Beaker glass 50 mL
- Labu hisap
- Chamber KLT
- Plat KLT
- Corong Büchner
- Pengaduk kaca
- Neraca
- Lampu UV λ 254 nm dan λ 366 nm (Camag UV-Cabinet II)
- alat evaporator Buchii
- Spektrometer Infra Red Shimadzu FTIR 8201
- Kromatografi gas (GC) Hewlett Packard 5890 series II
- Spatula
- Mortar
- Oven
- Termometer
- Desikator
- Kolom kromatografi
- Alat ukur Melting-point (opsional)

2. Bahan-bahan yang digunakan

- Bagian tumbuhan (Biji mahoni, Buah mahkota dewa, Daun kelor, Daun binahong, Daun sirih hijau, Daun sirih merah, dll) – pilih salah satu n-Heksana
- Etanol Reagen Mayer
- Larutan HCl 10%
- Larutan NaOH 2%
- Logam Mg
- Larutan H₂SO₄ 10%
- Anhidrida asam asetat
- Reagen Dragendorff
- Aquades
- Silika gel Merck 60 (60-70 mesh)
- Merck Kieselgel 60 GF254 0,25 mm
- Larutan CeSO₄ dalam H₂SO₄ encer 0,056%

D. PROSEDUR PERCOBAAN

Percobaan 3.1. Penyiapan sampel.

1. Biji mahoni (atau bahan alam lain) dibersihkan, dikeringkan, dan dihaluskan.
2. Sebanyak 1000 g serbuk dimaserasi dengan n-heksana selama 3x24 jam untuk mengambil senyawa non polar. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan pengurangan tekanan menggunakan evaporator Buchii sampai semua pelarut habis dan diperoleh minyak.
3. Ampas bebas minyak dimaserasi dengan etanol selama 3 x 24 jam untuk mengambil senyawa semi polar dan polar yang terdapat di dalamnya. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan pengurangan tekanan menggunakan evaporator Buchii hingga diperoleh ekstrak etanol yang sudah kering.

Percobaan 3.2. Uji Fitokimia dan KLT

1. Minyak dan ekstrak etanol yang diperoleh ditambah pereaksi untuk uji fitokimia yaitu mengidentifikasi adanya senyawa metabolit sekundernya, seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

Metabolit sekunder	Pereaksi	Pengamatan
Alkaloid	Dragendorff	Endapan jingga
Alkaloid	Mayer	Endapan putih
Flavonoid	HCl + Mg	Merah jingga/merah ungu
Saponin	Air	Buih stabil selama 5 menit
Steroid	Anhidrida asam asetat+ H ₂ SO ₄	Hijau biru
Terpenoid	Anhidrida asam asetat+ H ₂ SO ₄	Merah/ungu

a. Identifikasi alkaloid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan HCl 2 N sebanyak 1 mL dan aquades sebanyak 6 mL. Campuran dipanaskan selama 2 menit. Setelah itu, didinginkan dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat sebanyak 4 mL direaksikan dengan 1 mL pereaksi Dragendorff atau pereaksi Mayer. Pada pereaksi Mayer, keberadaan alkaloid akan ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau krem, sedangkan pada pereaksi Dragendorff, adanya alkaloid ditunjukkan dengan munculnya endapan berwarna jingga.

Pereaksi Mayer terdiri dari larutan pertama (1,36 g HgCl₂ + 60 ml akuades) dan larutan kedua (5 g KI + 10 ml akuades). Larutan pertama dituangkan ke dalam larutan yang kedua, lalu diencerkan dengan akuades sampai batas 100 ml dalam labu takar.

Pereaksi Dragendorff: Sebanyak 8 g KI dilarutkan dalam 20 mL akuades, sedangkan pada bagian yang lain dilarutkan 0,85 g bismut subnitrat dalam 10 mL asam asetat glasial dan 40 mL akuades. Kedua larutan ini kemudian dicampurkan, lalu disimpan dalam botol berwarna coklat.

b. Identifikasi Flavanoid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, campuran disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah sedikit serbuk Mg serta

larutan HCl 10% sebanyak 1 mL. Tanda bahwa sampel positif mengandung flavonoid yaitu terbentuknya warna merah, jingga atau kuning.

c. Identifikasi saponin

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas. Setelah itu, ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Tanda bahwa sampel positif mengandung saponin yaitu terbentuknya busa permanen selama 5 menit.

d. Identifikasi steroid dan terpenoid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Tanda bahwa sampel positif mengandung steroid yaitu menghasilkan warna hijau atau biru, sedangkan positif terpenoid yaitu menghasilkan warna merah atau ungu. Pereaksi Liebermann-Burchard dibuat dengan mencampurkan 5 mL anhidrida asam asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dalam 50 mL etanol absolut.

2. Jika dalam ekstrak etanol terdapat senyawa alkaloid, maka kemudian dilakukan prosedur isolasi khusus untuk senyawa alkaloid sebagai berikut.

Sebanyak 10 g ekstrak etanol yang sudah kering dimasukkan dalam gelas kimia, ditambah 100 mL larutan HCl 10% dan 100 mL dietil eter, kemudian diaduk hingga semua ekstrak larut. Campuran dipindahkan ke dalam corong pisah, dikocok, didiamkan, dan dipisahkan. Fase larutan asam diambil dan dilakukan alkalisasi dengan 50 mL larutan Ammonia 10%, kemudian ditambah CHCl_3 dan dipisahkan. Fase organik (ekstrak CHCl_3) berisi alkaloid primer, sekunder, dan tersier, sedangkan fase anorganik (ekstrak larutan basa) berisi alkaloid kuartener. Fase organik (A) dan anorganik (B) diambil, dan masing-masing dievaporasi dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kering alkaloid kasar.

3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mencari eluen yang sesuai pada saat kromatografi kolom. Prosedurnya adalah sebagai berikut.

- 1) Siapkan plat KLT silika GF₂₅₄ dengan ukuran p x l = 10 cm x 2 cm.
- 2) Beri garis dengan pensil secara hati-hati (jangan sampai silika plat KLT tergores), dengan jarak $\frac{1}{2}$ cm dari bawah dan atas plat sebagai batas elusi.
- 3) Siapkan eluen yaitu n-Heksana:Etanol (4:6), sebanyak 10 mL
- 4) Masukkan eluen ke dalam dua buah chamber, masing-masing sebanyak 10 mL.
- 5) Tutup chamber dan biarkan chamber jenuh dengan uap eluen.
- 6) Larutkan sejumlah sampel A ke dalam etanol, begitu juga dengan sampel B.

- 7) Totolkan secara hati-hati larutan sampel A dan B pada plat KLT sesuai batas bawah yang telah dibuat. Tunggu sampai totolan pertama kering, kemudian totolkan lagi. Lakukan beberapa kali penotolan sampai sampel dirasa cukup untuk dielusikan.
- 8) Masukkan plat KLT ke dalam chamber, tutup, dan elusikan sampai batas atas yang telah dibuat.
- 9) Setelah mencapai batas atas, elusi dihentikan dengan cara mengambil plat KLT. Angin-anginkan hingga kering.
- 10) Lihat di bawah lampu UV.
- 11) Jika noda tidak terlihat, maka plat KLT dapat disemprot dengan penampak noda yaitu larutan CeSO_4 dalam H_2SO_4 encer 0,056%, kemudian dioven pada suhu $50\text{ }^\circ\text{C}$ selama 10 menit hingga muncul noda hitam.
- 12) Beri tanda dengan pensil secara hati-hati pada noda yang terlihat.
- 13) Hitung harga R_f masing-masing noda.
- 14) Lakukan dengan berbagai perbandingan eluen hingga pemisahan berjalan baik, yaitu $R_f = 0,3 - 0,7$.
- 15) Jika pemisahan pada klt sudah baik, maka eluen yang digunakan pada KLT dapat digunakan pada kromatografi kolom.

Percobaan 3.3. Isolasi 1: Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

- 1) Timbang silika gel sebanyak 100 g.
- 2) Silika gel dioven pada suhu $120\text{ }^\circ\text{C}$ selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator.
- 3) Silika gel ditambah 100 mL n-Heksana, aduk hingga menjadi bubur silika.
- 4) Masukkan bubur silika ke dalam kolom kromatografi.
- 5) Kolom silika dibiarkan 1 x 24 jam (bisa sambil diketuk-ketuk) hingga mampat dan tidak ada gelembung udara di dalam kolom silika.
- 6) Timbang sampel ekstrak etanol sebanyak 10 gram, impregnasi pada 10 gram silika gel (ekstrak dicampur dengan silika gel kemudian digerus dengan mortar hingga homogen).
- 7) Letakkan kertas saring di atas bubur silika dalam kolom sebagai alas sampel.
- 8) Masukkan sampel k dalam kolom silika secara merata di permukaan kertas saring.
- 9) Elusikan secara pelan-pelan.
- 10) Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol vial setiap 5 mL.
- 11) Tambahkan eluen secara berkala dan meningkat kepolarannya/gradient setiap kali eluen di dalam kolom mulai berkurang (dijaga agar kolom silika selalu tertutup oleh eluen).

- 12) Sesekali dicek dengan cara menotolkan sedikit fraksi di plat KLT dan dilihat di bawah lampu UV. Jika masih terdapat noda, maka berarti masih terdapat komponen senyawa di dalam sampel yang dielusi.
- 13) Setelah elusi dirasa cukup (tidak ada lagi noda dalam fraksi dari kolom silika), maka elusi dihentikan.

Percobaan 3.4. Isolasi 2: KLT hasil Kromatografi Kolom

- 1) Semua fraksi yang diperoleh dari Percobaan 3.3. dilakukan KLT secara bersamaan dalam 1 plat KLT.
- 2) Proses KLT mengikuti prosedur pada Percobaan 3.2. dengan menggunakan eluen yang sesuai.
- 3) Fraksi-fraksi yang memiliki noda dengan harga Rf yang hampir sama, kemudian dijadikan satu dan dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kering alkaloid murni.

Percobaan 3.5. Identifikasi Isolat

1. Uji alkaloid dengan reagen
Isolat dimasukkan ke tabung reaksi. Kemudian ditambahkan HCl 2 N sebanyak 1 mL dan aquades sebanyak 6 mL. Campuran dipanaskan selama 2 menit. Setelah itu, didinginkan dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat sebanyak 4 mL direaksikan dengan 1 mL pereaksi Mayer. Tanda bahwa sampel positif mengandung alkaloid yaitu terbentuknya endapan putih.
2. Identifikasi gugus fungsi dengan FTIR
 - a. Sebanyak 2 mg dicampur dengan 100 mg serbuk kering KBr dan ditumbuk halus. Campuran tersebut dimampatkan dalam cetakan menggunakan pompa hidrolik
 - b. sehingga membentuk kepingan tipis (pelet). Karakterisasi terhadap kepingan sampel dilakukan dengan spektrofotometer FTIR.
3. Identifikasi serapan UV-Vis
Sampel sebanyak 2 mg dilarutkan dalam etanol pada labu ukur 10 ml. Larutan sampel dimasukkan ke dalam kuvet, diinkubasi selama 30 menit dan dianalisis pada panjang gelombang 200-600 nm.

E. PERTANYAAN DAN TUGAS

1. Pelarut yang akan digunakan dalam proses isolasi senyawa harus memiliki beberapa kriteria. Sebutkan dan jelaskan kriteria tersebut!
2. Bagaimana membuat kolom silika yang mampat dan bebas gelembung udara?
3. Mengapa sampel perlu di-impregnasi pada silika?

4. Tuliskan reaksi yang terjadi antara pereaksi Dragendorff dengan senyawa alkaloid hingga diperoleh endapan jingga!
5. Jika dapat diramalkan, maka gugus-gugus fungsi apa sajakah yang akan muncul di dalam spektrum IR senyawa alkaloid?

F. REFERENSI

- Jati, N.K., Prasetya, A.T., and Mursiti, S., 2019, Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Alkaloid pada Daun Pepaya, *Jurnal MIPA*, 6(2): 1-6.
- Mursiti, S., Matsjeh, S., Jumina, and Mustofa, 2016, The Hypoglycemia Effect of Alkaloid Compounds from Oil Free Mahagony Seeds (*Swietenia macrophylla*, King), *European Journal of Medicinal Plants*, 16(4): 1-5.
- Mursiti, S., 2017, Isolation and Antimicrobial Activity of Flavonoid Compounds from Mahagony Seeds (*Swietenia macrophylla*, King), *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 172(1): 012055.
- Mursiti, S., and Matsjeh, S., 2013, Isolasi, Identifikasi, Dan Elusidasi Struktur Senyawa Alkaloid Dalam Ekstrak Metanol-Asam Nitrat Dari Biji Mahoni Bebas Minyak (*Swietenia macrophylla*, King), *Jurnal MIPA*, 34(2).
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., and Engel, R.G., 1988, *Introduction to Organic Laboratory Techniques - Small-Scale Approach*, 1st Ed., Harcourt Brace: Florida.

G. LEMBAR PENGAMATAN

LEMBAR PENGAMATAN PRAKTIKUM (ISOLASI SENYAWA ALKALOID)

Nama Mahasiswa :

Kelompok :

Tanggal :

A. Hasil Maserasi dengan n-Heksana

Berat bahan (g)	Volume ekstrak (mL)	Warna	Massa jenis (g/mL)	Rendemen

B. Hasil Maserasi dengan Etanol

Berat bahan (g)	Berat ekstrak (g)	Warna	Titik leleh (°C)	Rendemen

C. Uji Fitokimia

Pereaksi	Pengamatan		Kesimpulan	
	Minyak	Ekstrak etanol	Minyak	Ekstrak etanol
Dragendorff				
Mayer				
HCl + Mg				
Air				
Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄				
Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄				

D. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Awal

Sampel: ekstrak kering alkaloid kasar

eluen	Noda	R _f
n-Heksana: Etil asetat (3:2)	1	

	2	
	3	
	
Metanol:Etil asetat (4:1)	1	
	2	
	
Metanol:Etil asetat (3:2)	1	
	2	
	
....		

E. Hasil Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Sampel: ekstrak kering flavonoid kasar

Eluen:

Nomor Vial	Warna
1	
2	
3	
....	

F. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi KKG

Sampel: fraksi hasil KKG

Eluen:

Nomor Vial	Noda	R _f
1	1	
	2	
	
2	1	
	2	
	
....		

G. Hasil Identifikasi Isolat

Identifikasi dengan reagen

Reagen	Pengamatan	Hasil
Mayer		

Dragendorff		
-------------	--	--

Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis

Sampel	λ_{maks} (nm)
Isolat	

Identifikasi dengan spektrofotometer infra merah

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus fungsi

H. Simpulan

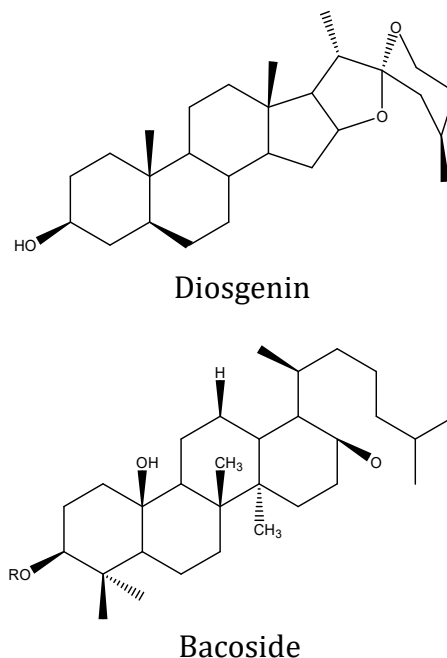
TOPIK 3C. ISOLASI SENYAWA SAPONIN

A. TUJUAN PERCOBAAN

Mahasiswa dapat mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa saponin dari bagian tumbuhan.

B. PENDAHULUAN

Saponin merupakan kelompok senyawa yang dicirikan oleh struktur yang mengandung steroid aglikon atau triterpenoid aglikon dan satu atau lebih rantai gula. Inti dasar saponin terdiri dari 3 cincin dan 6 anggota (kerangka fenantren) yang difusikan dengan satu cincin 5 anggota. Saponin diklasifikasikan menjadi dua yaitu saponin steroid dan saponin triterpenoid. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C27) dan molekul karbohidrat dan bila dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang dikenal sebagai saponin. Saponin triterpenoid tersusun atas inti triterpenoid dan karbohidrat dan bila dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang disebut sapogenin. Struktur senyawa saponin dua diantaranya tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Contoh struktur senyawa saponin

Saponin membentuk larutan koloidal yang berbuih jika dikocok dengan air. Bahan alam penghasil saponin menjadi fokus penelitian beberapa tahun terakhir ini untuk

meningkatkan kegunaan saponin dan manfaatnya dalam bidang kesehatan seperti antikolesterol, antikanker. mengurangi lemak badan, dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Pada tumbuhan, saponin berfungsi melindungi dari mikroba dan jamur.

C. ALAT DAN BAHAN

1. Alat-alat yang digunakan

- Labu Erlenmeyer 150 mL
- Kertas saring
- Beaker glass 50 mL
- Labu hisap
- Chamber KLT
- Plat KLT
- Corong Büchner
- Pengaduk kaca
- Neraca
- Alat evaporator Buchii
- Lampu UV λ 254 nm dan λ 366 nm (Camag UV-Cabinet II)
- Spektrometer Infra Red Shimadzu FTIR 8201
- Kromatografi gas (GC) Hewlett Packard 5890 series II
- Spatula
- Mortar
- Oven
- Termometer
- Desikator
- Kolom kromatografi
- Alat ukur Melting-point (opsional)

2. Bahan-bahan yang digunakan

- Bagian tumbuhan (Biji mahoni, Buah mahkota dewa, Daun kelor, Daun binahong, Daun sirih hijau, Daun sirih merah, dll) – pilih salah satu
- n-Heksana
- Etanol
- n-Butanol
- Larutan HCl 10%
- Larutan NaOH 2%
- Logam Mg
- Larutan H₂SO₄ 10%
- Anhidrida asam asetat
- Reagen Dragendorff
- Reagen Mayer
- Aquades
- Silika gel Merck 60 (60-70 mesh)
- Merck Kieselgel 60 GF254 0,25 mm
- Larutan CeSO₄ dalam H₂SO₄ encer 0,056%

D. PROSEDUR PERCOBAAN

Percobaan 3.1. Penyiapan sampel.

1. Biji mahoni (atau bahan alam lain) dibersihkan, dikeringkan, dan dihaluskan.

2. Sebanyak 1000 g serbuk dimaserasi dengan n-heksana selama 3x24 jam untuk mengambil senyawa non polar. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan pengurangan tekanan menggunakan evaporator Buchii sampai semua pelarut habis dan diperoleh minyak.
3. Ampas bebas minyak dimaserasi dengan etanol selama 3 x 24 jam untuk mengambil senyawa semi polar dan polar yang terdapat di dalamnya. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan pengurangan tekanan menggunakan evaporator Buchii hingga diperoleh ekstrak etanol yang sudah kering. Amati dan catat warna ekstrak, lalu hitung massa, titik leleh, dan rendemen ekstrak.

Percobaan 3.2. Uji Fitokimia dan KLT

1. Minyak dan ekstrak etanol yang diperoleh ditambah pereaksi untuk uji fitokimia yaitu mengidentifikasi adanya senyawa metabolit sekundernya, seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

Metabolit sekunder	Pereaksi	Pengamatan
Alkaloid	Dragendorff	Endapan jingga
Alkaloid	Mayer	Endapan putih
Flavonoid	HCl + Mg	Merah jingga/merah ungu
Saponin	Air	Buih stabil selama 5 menit
Steroid	Anhidrida asam asetat+ H ₂ SO ₄	Hijau biru
Terpenoid	Anhidrida asam asetat+ H ₂ SO ₄	Merah/ungu

a. Identifikasi alkaloid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan HCl 2 N sebanyak 1 mL dan aquades sebanyak 6 mL. Campuran dipanaskan selama 2 menit. Setelah itu, didinginkan dan disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat sebanyak 4 mL direaksikan dengan 1 mL pereaksi Dragendorff atau pereaksi Mayer. Pada pereaksi Mayer, keberadaan alkaloid akan ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau krem, sedangkan pada pereaksi Dragendorff, adanya alkaloid ditunjukkan dengan munculnya endapan berwarna jingga.

Pereaksi Mayer terdiri dari larutan pertama (1,36 g HgCl₂ + 60 ml akuades) dan larutan kedua (5 g KI + 10 ml akuades). Larutan pertama dituangkan ke dalam larutan yang kedua, lalu diencerkan dengan akuades sampai batas 100 ml dalam labu takar.

Pereaksi Dragendorff: Sebanyak 8 g KI dilarutkan dalam 20 mL akuades, sedangkan pada bagian yang lain dilarutkan 0,85 g bismut subnitrat dalam 10 mL asam asetat glasial dan 40 mL akuades. Kedua larutan ini kemudian dicampurkan, lalu disimpan dalam botol berwarna coklat.

b. Identifikasi Flavanoid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, campuran disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah sedikit serbuk Mg serta larutan HCl 10% sebanyak 1 mL. Tanda bahwa sampel positif mengandung flavonoid yaitu terbentuknya warna merah, jingga atau kuning.

c. Identifikasi saponin

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas. Setelah itu, ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Tanda bahwa sampel positif mengandung saponin yaitu terbentuknya busa permanen selama 5 menit.

d. Identifikasi steroid dan terpenoid

Sebanyak 2 mL hasil ekstraksi dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Tanda bahwa sampel positif mengandung steroid yaitu menghasilkan warna hijau atau biru, sedangkan positif terpenoid yaitu menghasilkan warna merah atau ungu. Pereaksi Liebermann-Burchard dibuat dengan mencampurkan 5 mL anhidrida asam asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dalam 50 mL etanol absolut.

2. Jika dalam ekstrak etanol terdapat senyawa saponin, maka kemudian dilakukan prosedur isolasi khusus untuk senyawa saponin sebagai berikut.

Sebanyak 10 g ekstrak etanol yang sudah kering dimasukkan dimasukkan dalam gelas kimia, ditambah 100 mL aquades dan 100 mL n-butanol, kemudian diaduk hingga semua ekstrak larut. Campuran dipindahkan ke dalam corong pisah, dikocok, didiamkan, dan dipisahkan. Fase n-butanol diambil kemudian dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kering saponin kasar.

3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mencari eluen yang sesuai pada saat kromatografi kolom. Prosedurnya adalah sebagai berikut.

- 1) Siapkan plat KLT silika GF₂₅₄ dengan ukuran p x l = 10 cm x 2 cm.
- 2) Beri garis dengan pensil secara hati-hati (jangan sampai silika plat KLT tergores), dengan jarak ½ cm dari bawah dan atas plat sebagai batas elusi.
- 3) Siapkan eluen yaitu n-Heksana:Etanol (4:6), sebanyak 10 mL

- 4) Masukkan eluen ke dalam dua buah chamber, masing-masing sebanyak 10 mL.
- 5) Tutup chamber dan biarkan chamber jenuh dengan uap eluen.
- 6) Larutkan sejumlah sampel saponin kasar.
- 7) Totolkan secara hati-hati larutan sampel sesuai batas bawah yang telah dibuat. Tunggu sampai totolan pertama kering, kemudian totolkan lagi. Lakukan beberapa kali penotolan sampai sampel dirasa cukup untuk dielusikan.
- 8) Masukkan plat KLT ke dalam chamber, tutup, dan elusikan sampai batas atas yang telah dibuat.
- 9) Setelah mencapai batas atas, elusi dihentikan dengan cara mengambil plat KLT. Angin-anginkan hingga kering.
- 10) Lihat di bawah lampu UV.
- 11) Jika noda tidak terlihat, maka plat KLT dapat disemprot dengan penampak noda yaitu larutan CeSO_4 dalam H_2SO_4 encer 0,056%, kemudian dioven pada suhu $50\text{ }^\circ\text{C}$ selama 10 menit hingga muncul noda hitam.
- 12) Beri tanda dengan pensil secara hati-hati pada noda yang terlihat.
- 13) Hitung harga R_f masing-masing noda.
- 14) Lakukan dengan berbagai perbandingan eluen hingga pemisahan berjalan baik, yaitu $R_f = 0,3 - 0,7$.
- 15) Jika pemisahan pada klt sudah baik, maka eluen yang digunakan pada KLT dapat digunakan pada kromatografi kolom.

Percobaan 3.3. Isolasi 1: Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

- 1) Timbang silika gel sebanyak 100 g.
- 2) Silika gel dioven pada suhu $120\text{ }^\circ\text{C}$ selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator.
- 3) Silika gel ditambah 100 mL n-Heksana, aduk hingga menjadi bubur silika.
- 4) Masukkan bubur silika ke dalam kolom kromatografi.
- 5) Kolom silika dibiarkan 1 x 24 jam (bisa sambil diketuk-ketuk) hingga mampat dan tidak ada gelembung udara di dalam kolom silika.
- 6) Timbang sampel ekstrak etanol sebanyak 10 gram, impregnasi pada 10 gram silika gel (ekstrak dicampur dengan silika gel kemudian digerus dengan mortar hingga homogen).
- 7) Letakkan kertas saring di atas bubur silika dalam kolom sebagai alas sampel.
- 8) Masukkan sampel ke dalam kolom silika secara merata di permukaan kertas saring.
- 9) Elusikan secara pelan-pelan.

- 10) Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol vial setiap 5 mL.
- 11) Tambahkan eluen secara berkala dan meningkat kepolarannya/gradient setiap kali eluen di dalam kolom mulai berkurang (dijaga agar kolom silika selalu tertutup oleh eluen).
- 12) Seseekali dicek dengan cara menotolkan sedikit fraksi di plat KLT dan dilihat di bawah lampu UV. Jika masih terdapat noda, maka berarti masih terdapat komponen senyawa di dalam sampel yang dielusi.
- 13) Setelah elusi dirasa cukup (tidak ada lagi noda dalam fraksi dari kolom silika), maka elusi dihentikan.

Percobaan 3.4. Isolasi 2: KLT hasil Kromatografi Kolom

- 4) Semua fraksi yang diperoleh dari Percobaan 3.3. dilakukan KLT secara bersama-sama dalam 1 plat KLT.
- 5) Proses KLT mengikuti prosedur pada Percobaan 3.2. dengan menggunakan eluen yang sesuai.
- 6) Fraksi-fraksi yang memiliki noda dengan harga Rf yang hampir sama, kemudian dijadikan satu dan dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kering flavonoid murni.

Percobaan 3.5. Identifikasi isolat

4. Uji flavonoid dengan reagen

Isolat dimasukkan ke tabung reaksi. Kemudian ditambahkan air panas. Setelah itu, ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Tanda bahwa sampel positif mengandung saponin yaitu terbentuknya busa permanen selama 15 menit.

5. Identifikasi gugus fungsi dengan FTIR

- a. Sebanyak 2 mg dicampur dengan 100 mg serbuk kering KBr dan ditumbuk halus. Campuran tersebut dimampatkan dalam cetakan menggunakan pompa hidrolik
- b. sehingga membentuk kepingan tipis (pelet). Karakterisasi terhadap kepingan sampel dilakukan dengan spektrofotometer FTIR.

6. Identifikasi serapan UV-Vis

Sampel sebanyak 2 mg dilarutkan dalam etanol pada labu ukur 10 ml. Larutan sampel dimasukkan ke dalam kuvet, diinkubasi selama 30 menit dan dianalisis pada panjang gelombang 200-600 nm.

E. PERTANYAAN DAN TUGAS

1. Mengapa silika gel yang akan digunakan pada kromatografi kolom harus dioven terlebih dahulu?
2. Jika noda tidak terlihat, maka plat KLT dapat disemprot dengan penampak noda yaitu larutan CeSO_4 dalam H_2SO_4 encer 0,056%, kemudian dioven pada suhu 50 °C selama 10 menit hingga muncul noda hitam. Jelaskan kelebihan dan kekurangan pemakaian penampak bercak pada proses KLT ini!
3. Pada proses kromatografi kolom, perlu sesekali dicek dengan cara menotolkan sedikit fraksi di plat KLT dan dilihat di bawah lampu UV. Mengapa hal ini perlu dilakukan?
4. Jika dapat diramalkan, maka gugus-gugus fungsi apa sajakah yang akan muncul di dalam spektrum IR senyawa saponin?

F. REFERENSI

- Mursiti, S., 2015. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Antihiperlipidemik dari Biji Mahoni (*Swieteniamacrophylla*, King). Disertasi. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Mursiti, S., 2017, Isolation and Antimicrobial Activity of Flavonoid Compounds from Mahogany Seeds (*Swietenia macrophylla*, King), IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 172(1): 012055.
- Nugraha, A.C., Prasetya A.T., and Mursiti, S., 2017, Isolasi, identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid sebagai Antibakteri dari Daun Mangga, Indonesian Journal of Chemical Science, 6(2): 91-96.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., and Engel, R.G., 1988, Introduction to Organic Laboratory Techniques - Small-Scale Approach, 1st Ed., Harcourt Brace: Florida.
- Qomariyah, E., Mabrurroh, Mursiti, S., and Kusumo, E., 2019, .), Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Murbei (*Morus alba* Linn) Indonesian Journal of Chemical Science, 8(1): 16-22.

G. LEMBAR PENGAMATAN

LEMBAR PENGAMATAN PRAKTIKUM (ISOLASI SENYAWA SAPONIN)

Nama Mahasiswa :

Kelompok :

Tanggal :

G. Hasil Maserasi dengan n-Heksana

Berat bahan (g)	Volume ekstrak (mL)	Warna	Massa jenis (g/mL)	Rendemen (%)

H. Hasil Maserasi dengan Etanol

Berat bahan (g)	Berat ekstrak (g)	Warna	Titik leleh (°C)	Rendemen (%)

I. Uji Fitokimia

Pereaksi	Pengamatan		Kesimpulan	
	Minyak	Ekstrak etanol	Minyak	Ekstrak etanol
Dragendorff				
Mayer				
HCl + Mg				
Air				
Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄				
Anhidrida asam asetat + H ₂ SO ₄				

J. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Awal

Sampel: ekstrak kering saponin kasar

eluen	Noda	R _f
n-Heksana: Etil asetat (3:2)	1	
	2	
	3	

	
Metanol:Etil asetat (4:1)	1	
	2	
	
Metanol:Etil asetat (3:2)	1	
	2	
	
....		

K. Hasil Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Sampel: ekstrak kering saponin kasar

Eluen:

Nomor Vial	Warna
1	
2	
3	
....	

L. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi KKG

Sampel: fraksi hasil KKG

Eluen:

Nomor Vial	Noda	R _f
1	1	
	2	
	
2	1	
	2	
	
....		

G. Hasil Identifikasi Isolat

Titik leleh:

Identifikasi dengan reagen

Reagen	Pengamatan	Hasil
Air		

Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis

Sampel	λ_{maks} (nm)
Isolat	

Identifikasi dengan spektrofotometer infra merah

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus fungsi

H. Simpulan
