



FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS
MULAWARMAN

PENUNTUN PRAKTIKUM

ISOLASI SENYAWA BAHAN ALAM FARMASI

Disusun Oleh : Tim Pengajar Mata
Kuliah Isolasi Senyawa Bahan
Alam Farmasi



LABORATORIUM
PENGAJARAN SAINS DAN
TEKNOLOGI FARMASI
UNIVERSITAS
MULAWARMAN

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	<i>i</i>
PANDUAN PENILAIAN PRAKTIKUM.....	<i>ii</i>
BAB I KROMATOGRAFI CAIR VAKUM	5
BAB II KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT).....	8
BAB III KROMATOGRAFI KOLOM KONVENSIONAL.....	13
BAB IV KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF	20
BAB V KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS 2 DIMENSI (UJI KEMURNIAN).....	23
BAB VI PENENTUAN STRUKTUR ANALISIS INSTRUMEN	26

PANDUAN PENILAIAN PRAKTIKUM

A. Hasil Belajar Praktikum (HBP)

Hasil belajar praktikum bersumber dari Pelaksanaan Praktikum (PP) dengan presentase 70% dan Ujian Praktikum (UP) dengan presentase 30%. Kedua sumber nilai tersebut dapat dilakukan penjumlahan jika kedua sumber memiliki nilai minimal 0,1 dan jika salah satu sumber penilaian tersebut tidak memiliki nilai (nol) maka bilangan nol tersebut menjadi faktor pengali.

- Contoh 1:

Nilai PP = 70

Nilai UP = 0,1

Jumlah nilai P = 70,1

- Contoh 2

Nilai PP = 70

Nilai UP = 0

Jumlah nilai P = 0

Sehingga jika terjadi contoh no 2 maka,

Nilai kuliah teori (T) = 70

Nilai praktikum (P) = 0 (pengali) x

Jumlah nilai = 0

Penjumlahan tidak dapat dilakukan, melainkan nilai 0 menjadi faktor pengali sehingga total nilai (HBP) adalah $70 \times 0 = 0$ atau mendapatkan nilai E

B. Hasil Belajar Pelaksanaan Praktikum (HBPP) Setiap Pertemuan

Hasil belajar PP dilaksanakan setiap kali pertemuan yaitu **akumulasi nilai Kehadiran (KH), Tugas Pendahuluan (TP), nilai Aktivitas Praktikum (AP) dalam pelaksanaan praktikum, dan nilai Verifikasi Pembahasan Percobaan Praktikum (VPP)**. Nilai Kehadiran (KH), Tugas Pendahuluan (TP) dan Aktivitas Praktikum (AP) diberikan secara langsung pada setiap pelaksanaan praktikum oleh Asisten dan/Pembina Praktikum, sedangkan nilai Verifikasi Pembahasan Percobaan Praktikum (VPP) dapat diberikan pada pertemuan berikutnya/diluar waktu pelaksanaan praktikum. Asisten Praktikum/Dosen Pembina Praktikum wajib memberikan kisi-kisi pembahasan yang harus dibuat dari setiap percobaan praktikum.

Pembahasan wajib dikerjakan di rumah (*take home*) oleh mahasiswa setelah praktikum dilakukan, hal ini terkait dengan data hasil percobaan yang dilakukan. VPP bersifat individual oleh mahasiswa atau bukan kelompok, namun dapat dikerjakan secara berkelompok. Seluruh pembahasan soal percobaan praktikum akan diverifikasi oleh pembina praktikum pada pertemuan berikutnya/diluar waktu pelaksanaan praktikum berdasarkan kesepakatan keduanya. Verifikasi jawaban dapat juga dilakukan secara lisan kepada praktikan oleh pembina praktikum.

Hasil Belajar Pelaksanaan Praktikum (HBPP) setiap pertemuan bersumber dari kehadiran (KH) setiap pertemuan dengan skor 25%; Tugas Pendahuluan (TP) 10%; Aktivitas Praktikum (AP) 35% dan Verifikasi Pembahasan Percobaan Praktikum (VPP) 30%. Keempat sumber nilai tersebut dapat dilakukan penjumlahan jika ketiganya memiliki nilai minimal 0,1 dan jika salah satu sumber nilai tersebut tidak memiliki (nol) maka bilangan nol tersebut sebagai faktor pengali. vi

- Contoh 1:

Nilai KH pertemuan I = 25

Nilai TP pertemuan I = 10

Nilai AP pertemuan I = 35

Nilai VPP pertemuan I = 0,1

Jumlah nilai HBPP Pertemuan I = 70,1

Penjumlahan nilai dari empat sumber tersebut dapat dilakukan dengan nilai 70,1

- Contoh 2:

Nilai KH pertemuan I = 25

Nilai TP pertemuan I = 10

Nilai AP pertemuan I = 35

Nilai VPP pertemuan I = 0

Jumlah nilai HBPP Pertemuan I = 0

Penjumlahan nilai sebagai Hasil Belajar Pelaksanaan Praktikum setiap pertemuan tidak dapat dilakukan karena, melainkan pengalian sehingga total nilai HBPP = 0 atau tidak memiliki nilai pada pertemuan tersebut.

C. Total Hasil Belajar Pelaksanaan Praktikum (THBPP)

Total hasil belajar pelaksanaan praktikum (THBPP) merupakan rata-rata nilai HBPP/pertemuan, dengan rumus:

$$NPP = \frac{\sum NPPn}{\sum nP}$$

NPP : Rata-rata nilai pelaksanaan praktikum

$\sum NPPn$: Jumlah nilai PP seluruh pertemuan praktikum

$\sum nP$: Jumlah pertemuan praktikum

Persyaratan pemberian nilai Pelaksanaan Praktikum dapat dilakukan jika mahasiswa terbukti hadir minimal 80 % (>80%) dari jumlah pertemuan praktikum yang dilaksanakan.

D. Penilaian Kehadiran Praktikan

Penilaian kehadiran praktikan terdiri dari hadir penuh, hadir terlambat, dan tidak hadir.

Pengertian kehadiran tersebut adalah:

1. Hadir penuh yaitu mahasiswa yang hadir tepat waktu hingga 10 menit setelah waktu praktikum dimulai.
2. Hadir terlambat yaitu:
 - a. Hadir terlambat >10 hingga ≤ 30 menit setelah praktikum dimulai, praktikan akan mendapat pengurangan nilai KH, TP, AP, dan VPP sebanyak 50-70%.
 - b. Hadir terlambat >30 hingga ≤ 60 menit setelah praktikum dimulai, praktikan akan mendapatkan pengurangan nilai KH, TP, AP, dan VPP sebanyak 75-95%.
 - c. Hadir terlambat > 60 menit setelah praktikum dimulai, praktikan akan mendapatkan pengurangan nilai KH, TP, AP, dan VPP sebanyak 100% atau tanpa penilaian.
3. Tidak hadir yaitu praktikan tidak hadir selama praktikum berlangsung pada pertemuan tertentu, dan kepadanya tidak mendapatkan penilaian pada pertemuan tersebut. Jika tidak hadir disebabkan oleh sakit dengan bukti keterangan dokter, kepadanya dapat diberikan kesempatan untuk mengikuti praktikum dengan kelas lain, jika percobaan yang dimaksud telah dilakukan praktikum maka praktikan dengan sangat menyesal kehilangan satu kali pertemuan. Keterangan dokter akan ditelusuri oleh Pembina Praktikum dan asisten tentang kebenarannya, dan jika terbukti bahwa yang bersangkutan melakukan kebohongan, maka kepada praktikan tidak diperkenankan melanjutkan praktikum dan mendapatkan pengurangan pada total nilai praktikum hingga 70% atau mahasiswa tersebut membuat pengakuan melalui pernyataan bermaterai untuk tidak mengulangi kebiasaan buruknya.

BAB I

KROMATOGRAFI CAIR VAKUM

URAIAN UMUM

Salah satu metode yang dapat digunakan dalam pemisahan adalah kromatografi cair vakum (KCV). Prinsip dasar dari KCV ini adalah pemisahan secara adsorpsi dan partisi yang dipercepat dengan bantuan pompa vakum. Kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kemasan rapat yang maksimal, pelarut/eluen yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan adsorben lalu divakum kembali. Kolom dihisap hingga kering dan siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, pemisahan dimulai menggunakan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolarannya ditingkatkan perlahan-lahan.

TUJUAN PERCOBAAN

1. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengetahui dan memahami prinsip-prinsip kromatografi kolom vakum.
2. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengaplikasikan metode kromatografi kolom vakum dalam melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan/hewan.

KEGUNAAN PERCOBAAN DALAM ILMU KEFARMASIAN

Metode-metode pemisahan yang digunakan dalam tahapan isolasi senyawa aktif dari suatu bahan (bahan alam) salah satunya adalah teknik kromatografi cair vakum (KCV). Metode tersebut merupakan salah satu pemisahan dari berbagai metode pemisahan secara kromatografi yang proses pemisahannya dipercepat dengan pompa vakum. KCV juga sering digunakan untuk fraksinasi suatu ekstrak.

HUBUNGAN PERCOBAAN DENGAN MATERI KULIAH TEORI

Proses pembelajaran terkait metode kromatografi cair vakum pada praktikum ini diharapkan dapat meningkatkan pemahaman praktikan terkait materi isolasi senyawa bahan alam farmasi dengan kromatografi khususnya KCV.

CARA KERJA PERCOBAAN

Alat-alat yang digunakan pada praktikum ini adalah sebagai berikut:

- Kolom kromatografi vakum
- Statif + Klem
- Mortir dan Stamper
- Gelas ukur
- Cawan porselen
- Erlenmeyer
- Pompa vakum
- Botol Vial
- Silika gel 60 H
- Botol coklat
- Dan lain – lain
- Batang pengaduk

Bahan – bahan yang digunakan pada kegiatan praktikum ini adalah sebagai berikut:

- Ekstrak/fraksi kering
- Eluen (tergantung asisten)
- Kertas saring
- Silika gel
- Alumunium foil
- Dan lain-lain

Cara Kerja

1. Seperangkat kolom kromatografi vakum dicuci dan dipasang pada statif.
2. Silika gel 60 H dimasukkan dan dipadatkan dalam kolom dengan pompa vakum.
3. Cuplikan dicampur dengan silika (1:1) hingga menjadi serbuk kering.
4. Campuran cuplikan dalam silika dimasukkan dalam kolom (diatas adsorben).
5. Bagian atas ditutup dengan kertas saring untuk menghindari percikan waktu penambahan eluen.
6. Pelarut/ eluen yang kepolarannya rendah dimasukkan perlahan dengan dialiri pada batang pengaduk kedalam kolom kemudian di hisap dengan pompa vakum.
7. Pelarut/eluen yang keluar ditampung sebagai fraksi/subfraksi.

SOAL-SOAL

- 1) Apa yang dimaksud dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)?
- 2) Apa yang membedakan KCV dengan KKK?
- 3) Pada percobaa yang anda lakukan, jelaskan fase diam yang anda gunakan! Termasuk dalam fase apakah adsorben yang anda gunakan!
- 4) Jelaskan keuntungan dan kerugian dari metode KCV!
- 5) Jelaskan prinsip kerja dari metode KCV!

BAB II

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)

URAIAN UMUM

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dikembangkan oleh *Izmailoff* dan *Zchraiber* pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektrolisis. Pada KLT, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium, atau plat plastik. meskipun demikian kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom.

Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*). kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom. demikian juga peralatannya.

Beberapa keuntungan lain kromatografi planar :

- KLT banyak digunakan untuk tujuan analisis.
- Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet.
- Dapat dilakukan elusi secara menaik (*Ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi dua dimensi.
- Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.

Pemilihan Fase

1. Fase Diam KLT

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penyerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10 – 30 μm . semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya.

Penyerapan yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi yang utama pada KLT adalah **partisi dan adsorpsi**. lapisan tipis yang digunakan sebagai penyerap juga dapat dibuat dari silika yang telah

dimodifikasi, resin penukar ion, gel eksklusi, dan siklodekstrin yang digunakan untuk pemisahan kiral.

2. Modifikasi Fase Diam/Penyerap

Untuk tujuan tertentu, silika gel atau penyerap yang lain dapat dimodifikasi dengan cara pembaceman. beberapa diantaranya perlakuan terhadap penyerap:

- Perlakuan silikagel dengan KOH
- Pembacaan silikagel
- Kieselguhr sebagai pendukung lembam (*inert*)

3. Fase gerak pada KLT

4. Aplikasi (penotolan) sampel

5. Pengembangan

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap berikutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi dengan fase gerak. tepi bagian bawah lempeng yang telah ditotoli cuplikan dimasukkan ke dalam bejana kecil yang berisi cairan pengelusi yang tingginya kurang lebih 0,5 – 1 cm. tinggi cairan pengelusi di dalam bejana harus berada di bawah tempat penotolan pada pelat.

TUJUAN PERCOBAAN

Setelah mengikuti kegiatan praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengetahui dan memahami teknik-teknik kromatografi lapis tipis.

Setelah mengikuti kegiatan praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengaplikasikan prinsip-prinsip kromatografi lapis tipis dalam menganalisis atau mengidentifikasi senyawa-senyawa/ metabolit sekunder yang terdapat pada bahan alam/tumbuhan.

KEGUNAAN PERCOBAAN DALAM ILMU KEFARMASIAN

Kromatografi lapis tipis merupakan metode yang digunakan untuk mengamati pola pemisahan dari suatu campuran. Pola pemisahan tersebut dapat dilanjutkan untuk keperluan analisis atau uji aktivitas farmakologi secara kualitatif.

HUBUNGAN PERCOBAAN DENGAN MATERI KULIAH TEORI

Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu metode kromatografi yang mendasari metode-metode pemisahan lainnya. Oleh karena itu, pola pemisahan hasil KLT sering

dijadikan acuan dalam penggunaan suatu fase gerak pada metode kromatografi lain yang menggunakan fase diam yang sama, misalnya KLT preparatif dan juga kromatotron.

CARA KERJA PERCOBAAN

Alat-alat yang digunakan pada kegiatan praktikum ini adalah sebagai berikut:

- Gelas ukur
- Chamber/Staining jar
- Pipet volume
- Erlenmeyer
- Pipa kapiler
- Pipet tetes
- Botol semprot
- Lampu UV 254 dan 366 nm
- Dan lain sebagainya

Bahan-bahan yang digunakan pada kegiatan praktikum ini adalah sebagai berikut:

Ekstrak/fraksi ekstrak

- Plat KLT
- Metanol
- Kloroform
- N-Heksan
- Etil Asetat
- Reagen untuk identifikasi metabolit sekunder

Cara Kerja

1. Buat eluen masing-masing sebanyak 50 ml dengan prosedur sebagai berikut:
 - a. Hitung dan Ukur eluen; n-hexan/etil asetat dengan perbandingan, 6:4, 7:3, 8:2 dan 9:1; kloroform/metanol dengan perbandingan, 5:1 dan 7:1; kloroform/metanol/air dengan perbandingan 10:6:0,5
 - b. Pada eluen n-hexan/etil asetat dan kloroform/metanol langsung dicampur sesuai dengan perbandingannya masing-masing perlahan-lahan
 - c. Kocoklah hingga diperoleh larutan bening lalu dimasukkan kedalam botol, diberi label
 - d. Pada eluen kloroform/metanol/air, Masukkan air terlebih dahulu lalu Masukkan setengah metanol sambil diguncang
 - e. Masukkan kloroform dan sisa metanol sedikit demi sedikit sambil diguncang hingga cairan habis dan terlarut sempurna, ditandai dengan beningnya larutan
2. Larutkan semua fraksi-fraksi ekstrak yang terdapat dalam botol fial dengan kloroform/metanol dengan perbandingan 1:1 secukupnya hingga tercampur lalu tutup dengan aluminium foil
3. Panaskan plat KLT dalam termoliner dengan suhu 100°C
4. Potong plat KLT menjadi bagian-bagian kecil dengan panjang 7 cm dan lebar 2 cm
5. Beri garis batas bawah 1 cm dan batas atas ½ cm dengan menggunakan pensil
6. Lakukan penotolan larutan fraksi-fraksi dengan menggunakan pipa kapiler pada batas bawah lempeng (dua buah totol yang berbeda sesuai dengan kedekatan tingkat kepolarannya), diberi label
7. Masukkan seluruh eluen kemasing-masing gelas bening sampai kurang dari 1 cm dari permukaan dalam gelas, diberi label
8. Masukkan plat KLT yang telah ditotol ke setiap eluen yang mempunyai tingkat kepolaran yang sama
9. Amati kenaikan pelarut pada plat KLT dan jika telah sampai pada batas atas, diangkat plat KLT
10. Angin-anginkan plat KLT hingga kering lalu diamati spot warna yang timbul
11. Amati plat KLT yang telah kering dibawah sinar UV 254, 366 nm dan sinar tampak.
12. Gambar spot warna pada kertas kalkir yang telah dipotong sesuai bentuk plat KLT
13. Jepit menggunakan penjepit tabung plat KLT lalu disemprot dengan H₂SO₄ 10% lalu dipanaskan dengan menggunakan pemanasan di dalam termoliner atau dengan pemanasan langsung diatas kompor

14. Amati spot warna yang timbul serta digambar spot warna pada kertas kalkir
15. Amati spot warna, jika spot warna tidak jelas atau tidak terbentuk spot pada plat KLT diulangi dengan merubah eluen dengan perbandingan yang lain yang berbeda tingkat kepolarannya dengan eluen yang dipakai pertama.

SOAL-SOAL

- 1) Apa yang dimaksud dengan KLT?
- 2) Jelaskan tujuan dilakukannya KLT!
- 3) Apa yang dimaksud dengan fase diam dan fase gerak?
- 4) Sebutkan jenis-jenis fase diam yang anda ketahui!
- 5) Jelaskan perbedaan antara fase normal dan fase balik! Berikan contoh!
- 6) Termasuk fase apakah percobaan yang anda lakukan? Jelaskan!
- 7) Apa yang dimaksud dengan kromatogram? Jelaskan juga kromatogram yang anda peroleh dari percobaan!
- 8) Apa yang dimaksud dengan nilai R_f ? Jelaskan!
- 9) Bagaimana cara menghitung R_f ?
- 10) Pada pengamatan plat KLT dibawah sinar UV, terdapat bercak hitam pada sinar UV 254 dan bercak warna warni pada sinar UV 366, jelaskan mengapa hal tersebut dapat terjadi!
- 11) Jelaskan tujuan penggunaan Pereaksi Semprot H_2SO_4 10% dalam metanol pada plat KLT!
- 12) Hal apa yang membedakan analisis metabolit sekunder menggunakan KLT dengan pereaksi tetes? Jelaskan!

BAB III

KROMATOGRAFI KOLOM KONVENSIONAL

URAIAN UMUM

Kromatografi kolom konvensional adalah metode yang digunakan untuk memurnikan senyawa kimia tunggal dari campurannya (bahan alam). Kolom kromatografi dapat berupa pipa gelas yang dilengkapi dengan kran. Ukuran kolom tergantung pada banyaknya zat yang akan dipisahkan. Untuk menahan adsorben yang di dalam kolom dapat digunakan glass wool atau kapas. Prinsipnya hampir sama dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Apabila suatu cuplikan berupa campuran dari beberapa komponen dimasukkan melalui atas kolom, maka komponen yang diserap lemah oleh adsorben akan keluar lebih cepat bersama eluen, sedangkan komponen yang diserap kuat keluar lebih lama. Proses pemisahan tersebut dibantu oleh gaya gravitasi, oleh karena itu metode ini sering juga disebut kromatografi kolom gravitasi.

TUJUAN PERCOBAAN

1. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengetahui dan memahami prinsip-prinsip kromatografi kolom konvensional
2. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengaplikasikan metode kromatografi kolom konvensional dalam melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan/hewan.

KEGUNAAN PERCOBAAN DALAM ILMU KEFARMASIAN

Metode-metode pemisahan yang digunakan dalam tahapan isolasi senyawa aktif dari suatu bahan (bahan alam) salah satunya yang paling umum digunakan adalah teknik kromatografi kolom konvensional. Metode tersebut merupakan salah satu referensi dari berbagai metode pemisahan secara kromatografi yang dibantu oleh gaya gravitasi.

HUBUNGAN PERCOBAAN DENGAN MATERI KULIAH TEORI

Praktikan diharapkan dapat memahami proses dan tahap-tahap yang perlu dilakukann pada kromatografi kolom konvensional. Dengan demikian, praktikan dapat memahami metode tersebut secara langsung.

CARA KERJA PERCOBAAN

Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada praktikum ini adalah sebagai berikut:

- Kolom kromatografi
- Gelas ukur
- Erlenmeyer
- Botol Vial
- Botol coklat
- Batang pengaduk
- Statif + Klem
- Chamber
- Cawan porselen
- Mortir dan Stamper
- Dan lain – lain

2. Bahan

Bahan – bahan yang digunakan pada kegiatan praktikum ini adalah sebagai berikut:

- Ekstrak/ fraksi kering
- Eluen (tergantung asisten)
- Kertas saring
- Silika gel
- Alumunium foil
- Dan lain-lain

Cara Kerja

Pengemasan kolom kromatografi

1. Pengemasan Kering

- Fase diam dimasukkan ke dalam kolom dan dibiarkan mengendap, proses ini dapat dibantu dengan mengetuk-ngetuk secara perlahan dasar kolom pada permukaan yang keras dan juga mengetuk dinding kolom dengan batang yang fleksibel.
- Sampel dimasukkan ke dalam kolom, kemudian ditambahkan fase gerak dan dibiarkan bergerak melewati kolom.
- Aliran dibiarkan hingga mencapai ujung kolom dan keluar ke penampung
- Sulit untuk mendapatkan pita yang sempit dengan pengemasan kering dan sulit untuk mencapai aliran fase gerak yang seragam karena kesulitan mendapat pengemasan fase diam yang sama. Gelembung udara seringkali terperangkap saat fase gerak mengalir dan hal ini akan mengganggu aliran fase gerak.

2. Pengemasan Basah

- Ambil secukupnya fase diam yang dapat mengisi sekitar seperdua dari kolom.
- Cara yang paling mudah untuk melakukan hal ini adalah dengan cara mengisi seperdua dari kolom kering dengan serbuk fase diam yang kering, ketuk-ketuk agar turun dan tambahkan sedikit lagi jika perlu.
- Keluarkan kembali fase diam tersebut dari kolom tersebut dan timbang.
- Hal ini penting untuk mengetahui beratnya karena akan menentukan jumlah ekstrak yang dapat digunakan sehingga kolom tidak kelebihan muatan.
- Untuk fase diam 100 g harus digunakan ekstrak tidak lebih dari 1 g.
- Dilain pihak, jika untuk meminimalkan kehilangan akibat adsorpsi yang reversibel ke fase diam, maka tidak lebih dari 400 mg ekstrak per 100g fase diam yang digunakan.
- Fase diam kemudian disuspensikan dalam fase gerak yang telah dipilih atau satu yang kepolarannya lebih rendah. (jika digunakan sistem fase terbalik, digunakan yang kepolarannya lebih besar).
- Kocok hingga terbentuk suspensi.
- Suspensi yang dihasilkan harus memiliki sedikit ketahanan terhadap pengocokan, tetapi masih mudah untuk dituang. Jika suspensi terlalu kental, gelembung udara akan terperangkap dan hal ini menyebabkan gangguan aliran fase gerak.

- Dengan beberapa pelarut, misalnya kloroform, silika gel akan membentuk gel yang transparan dimana gelembung udara mudah terlihat, tetapi campuran lain memiliki penampakan seperti susu kental dan sulit untuk melihat jika ada gelembung yang terbentuk.
- Jika tersedia, wadah ultrasonik dapat digunakan untuk waktu yang singkat (kurang 5 menit) yang dapat membantu menghilangkan semua gas dari suspensi.
- Jepit atau letakkan kolom dalam posisi tegak lurus.
- Pastikan bahwa kran pada dasar kolom tertutup atau aliran keluar tidak dapat terjadi. Hal ini untuk mencegah keringnya kolom, menghindari rongga udara lagi dan mencegah aliran yang tidak merata dari suspensi yang dituang.
- Tuangkan suspensi dengan hati-hati dan perlahan-lahan ke dalam kolom
- Ketuk dinding kolom secara perlahan untuk mendorong gelembung udara yang ada naik ke bagian atas kolom.
- Setelah beberapa saat suspensi akan mengendap dan hal ini dapat dibantu dengan pengetukan secara perlahan ujung bawah kolom dan sisinya pada permukaan yang keras. Akan terlihat fase gerak berada beberapa centimeter diatas permukaan fase diam.
- Buka hati-hati kran kolom dan biarkan fase gerak mengalir dengan lambat sampai tinggi cairan supernatan diatas kolom kemas adalah kurang dari 2 cm.
- Tutup kran, yang paling penting ialah tidak membiarkan fase gerak bergerak hingga di bawah permukaan fase diam, karena jika ini terjadi akan masuk kedalam kolom, dan akhirnya menyebabkan aliran fase gerak yang tidak merata.

3. Penyiapan Sampel yang akan digunakan pada Kolom

- Ketinggian sampel yang akan digunakan pada awal sistem kromatografi harus dipertahankan sekecil mungkin untuk mencapai pemisahan yang baik.
- Jika melebar, pita-pita yang dihasilkan juga akan melebar dan akan tumpang tindih saat melewati kolom.
- Jika campuran yang dimasukkan tidak terdistribusi sebagaimana mestinya, tumpang tindih juga akan terjadi.
- Adalah mungkin menggunakan sampel dalam bentuk cairan, biasanya dalam larutan, langsung ditempatkan pada permukaan fase diam kering. Hal ini dapat menyebabkan pita menjadi tidak rata jika larutan yang diteteskan keseluruh permukaan dengan

menggerakkan pipet secara manual. Gaya dari cairan juga cenderung merusak susunan permukaan fase diam, dengan hasil yang sama.

- Hal ini dapat dicegah dengan melindungi permukaan dengan helaian kertas saring atau gelas fibre atau dengan sejumlah kecil pasir yang telah dicuci bersih. Tetapi sulit untuk menjamin bahwa telah ditempatkan volume sampel yang sama ke setiap inti daerah permukaan.
- Salah satu alternatif yang dapat digunakan adalah meninggalkan sejumlah kecil pelarut yang digunakan untuk mensuspensikan fase diam pada permukaan fase diam.
- Sampel cair yang dimasukkan selanjutnya bercampur dengan supernatan dan berdispersi dengan cepat membentuk larutan seragam.
- Metode ini menghasilkan pita yang lebih baik tetapi menyebabkan pengenceran sampel sehingga konsekuensinya dibutuhkan jumlah sampel awal yang lebih besar.
- Pada kedua metode ini, sampel telah dilarutkan dalam fase gerak yang pertama kali akan digunakan.
- Hal ini mungkin sulit, karena umumnya pelarut memiliki kepolaran yang lebih rendah (lebih tinggi jika digunakan kromatografi fase – terbalik) daripada ekstrak yang digunakan.
- Alternatif yang digunakan adalah menyalut sejumlah kecil fase diam dengan sampel dan selanjutnya ditaruh dibagian atas fase diam dalam kolom. Hal ini memiliki keuntungan yaitu sampel dapat dilarutkan dulu dalam pelarut dimana sampel tersebut mudah larut.

4. Cara Mencampur Sampel dengan Fase Diam

- Tentukan berat maksimum ekstrak yang akan dikolom pisahkan.
- Sebagai petunjuk umum 1 g ekstrak untuk setiap 100 g fase diam kering.
- Timbang jumlah yang tepat ekstrak kering (telah dievaporasi atau dibekukeringkan sebelumnya), tempatkan dalam gelas porselin atau gelas penguapan dan larutkan dalam tidak lebih dari 2,5 ml pelarut yang sesuai dengan volalitas yang masih dapat diterima. Dapat digunakan air jika alat beku-kering tersedia.
- Dalam *fume cupboard*, campur tidak lebih dari 2,5% fase diam dengan larutan ekstrak secara hati-hati sampai terbentuk dispersi yang sempurna. Pelarut yang lebih mudah menguap akan cepat menguap dan larutan akan sangat cepat menjadi kental dan seperti pasta.

- Ekstrak akan menjadi tersalut sempurna dengan fase diam dan menjadi kering serta menjadi serbuk kembali.
- Pelarut yang kurang mudah menguap mungkin memerlukan waktu selama semalam agar kering. Jika digunakan air untuk melarutkan sampel, pasta fase diam dan ekstrak dapat dibeku keringkan.
- Sampel siap untuk dimasukkan kedalam kolom.

5. Memasukkan Sampel ke dalam Kolom

- Sampel dapat dimasukkan sebagai serbuk pada bagian atas kolom, baik secara langsung sebagai serbuk atau sebagai suspensi dalam pelarut yang sama digunakan untuk mengemas kolom.
- Jika metode serbuk langsung disukai:
 - Gunakan spatula halus untuk mengoles campuran ekstrak/fase diam secara sempurna keseluruhan permukaan supernatan dalam kolom (tinggi supernatan tidak lebih dari 2 cm).
 - Mungkin berguna untuk mengoles lebih banyak fase diam ke supernatan segera sampel ditambahkan untuk mencegah pelarutan lanjutan ekstrak ke dalam fase gerak.
- Jika metode suspensi disukai:
 - Suspensikan campuran ekstrak/fase diam di dalam 2 ml pelarut yang sama digunakan untuk mengemas kolom.
 - Gunakan pipet pasteur untuk memindahkan suspensi ke supernatan dalam kolom, yakinkan bahwa suspensi telah terdistribusi sempurna ke seluruh permukaan.
 - Dengan hati-hati bukalah kran pada ujung kolom dan biarkan fase gerak mengalir hingga letak supernatan pada permukaan kolom tepat diatas fase diam (kurang 3 mm).
 - Bagian atas fase diap diperoleh dari sampel dan seringkali terwarnai.
 - Tutup kran untuk mencegah kekeringan kolom.
 - Mungkin berguna menambahkan lebih banyak fase diam ke dalam supernatan saat sampel telah ditambahkan untuk mencegah pelarutan lebih lanjut ekstrak didalam fase gerak.
 - Tambahkan aliquot fase gerak pertama pada bagian atas kolom.
 - Buka kran pada bagian bawah kolom dan atur aliran.
 - Kecepatan aliran optimum bergantung pada ukuran kolom, ukuran partikel fase diam dan adanya tekanan yang digunakan untuk meningkatkan kecepatan alir.

- Kecepatan alir untuk kolom yang panjangnya 15 cm dan diameter 2 cm tidak boleh lebih besar dari 1 ml/menit untuk kolom konvensional dan tidak lebih dari 5 ml/menit untuk flash kolom.
- Kumpulkan aliquot volume eluen.
- Pengumpul fraksi paling sering digunakan untuk tujuan ini dan mesin yang lebih modern dapat diprogram untuk mengumpulkan pada interval waktu tertentu secara otomatis.
- Volume aliquot bergantung pada ukuran kolom dan jumlah komponen maksimal untuk kolom yang panjangnya 15 cm dan diameter 2 cm harus 5 ml.
- Fraksi yang telah dikumpulkan harus dipantau, misalnya dengan KLT atau proses bioassay, fraksi yang memiliki profil yang sama dikumpul bersama.
- Kumpulan fraksi tersebut dikeringkan dan ditimbang.

SOAL-SOAL

1. Apa yang dimaksud dengan Kromatografi Kolom Konvensional (KKK)?
2. Jelaskan tujuan dilakukannya KKK?
3. Sebutkan jenis-jenis fase diam yang dapat digunakan pada KKK
4. Pada percobaan yang anda lakukan, jelaskan fase diam yang anda gunakan! Termasuk dalam fase apakah adsorben yang anda gunakan!
5. Apabila anda menggunakan kolom dengan diameter 2 cm, berapa banyak sampel yang dapat anda pisahkan dengan KKK?
6. Jelaskan hubungan dari panjang kolom, diameter kolom, laju pemisahan dan jumlah sampel pada KKK!
7. Jelaskan metode packing kolom yang anda ketahui!
8. Bagaimana cara anda mengatur laju pemisahan pada KKK? Jelaskan juga pengaruhnya dengan hasil pemisahan!

BAB IV

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF

URAIAN UMUM

Kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif merupakan salah satu metode pemisahan dengan menggunakan peralatan sederhana. Ketebalan adsorben yang sering dipakai adalah 0,5 - 2 mm. ukuran plat KLTp biasanya 20x20 cm. Penotolan cuplikan dilakukan dengan melarutkan cuplikan dalam sedikit pelarut. Cuplikan ditotolkan berupa pita dengan jarak sesempit mungkin karena pemisahan tergantung pada lebar pita. Pengembangan plat KLT preparatif dilakukan dalam bejana kaca yang dapat menampung beberapa plat. Bejana dijaga tetap jenuh dengan pelarut pengembang dengan bantuan kertas saring berdiri disekeliling permukaan dalam bejana. Adsorben yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄ yang dapat berfluoresensi apabila disinari dengan lampu ultraviolet. Pita yang diinginkan dikerok dari plat kaca, kemudian dilarutkan dengan pelarut yang sesuai agar terpisah dari adsorben.

TUJUAN PERCOBAAN

1. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengetahui dan memahami prinsip-prinsip KLT Preparatif.
2. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengaplikasikan metode KLT Preparatif dalam melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan/hewan.

KEGUNAAN PERCOBAAN DALAM ILMU KEFARMASIAN

Metode-metode pemisahan yang digunakan dalam tahapan isolasi senyawa aktif dari suatu bahan (bahan alam) salah satunya adalah teknik kromatografi lapis tipis preparatif (KLTp). Metode tersebut merupakan salah satu pemurnian dari berbagai metode pemisahan secara kromatografi yang dapat diamati menggunakan lampu UV. Fase gerak dipilih berdasarkan orientasi fase gerak yang memberikan pola pemisahan yang baik pada KLT biasa.

HUBUNGAN PERCOBAAN DENGAN MATERI KULIAH TEORI

Proses pembelajaran terkait metode kromatografi lapis tipis preparatif pada praktikum ini diharapkan dapat meningkatkan pemahaman praktikan terkait materi metode pemisahan dengan kromatografi khususnya KLT preparatif.

CARA KERJA PERCOBAAN

Pembuatan Lempeng

- Dibersihkan cetakan lempeng dengan ukuran 20 x 20 cm, lalu dibebas lemakkan dengan alkohol.
- Fase diam dibuat dengan mencampur air dengan silika gel GF 254 dengan perbandingan 2:1, lalu ditambahkan kanji (pengikat) sebanyak 1% dari jumlah silika gel.
- Dituang diatas cetakan lempeng yang telah diatur ketebalannya.
- Dibiarkan hingga kering dan diaktifkan dalam oven pada suhu 105-110°C selama 30 menit.

Teknik Isolasi

- Disiapkan sampel dengan melarutkan dalam pelarut tertentu.
- Ditotolkan dalam lempeng sesuai ukuran batas bawahnya membentuk garis lurus.
- Setelah kering, dielusi dengan eluen yang sesuai dalam chamber yang telah dijenuhkan (bisa tidak dijenuhkan).
- Diamati noda yang terbentuk dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm, atau disemprot dengan pereaksi noda (jika perlu)
- Noda yang terbentuk dikeruk dan ditampung dalam vial untuk selanjutnya dilarutkan dalam eluen (pelarut) tertentu untuk memisahkan dari silika gel.
- Terhadap hasil pemisahan dilakukan lagi uji KLT untuk melihat pola kromatogram.
- Jika diperoleh senyawa tunggal, dilakukan uji kemurnian untuk selanjutnya dilakukan identifikasi dan karakterisasi.

SOAL-SOAL

1. Apa yang dimaksud dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)?
2. Jelaskan prinsip dasar dari KLTP!
3. Apa perbedaan dari KLT dengan KLTP? Jelaskan!
4. Pada percobaan yang anda lakukan, jelaskan fase diam yang anda gunakan! Termasuk dalam fase apakah adsorben yang anda gunakan!
5. Jelaskan keuntungan dan kerugian menggunakan KLTP!
6. Fase gerak yang digunakan pada KLTP sama dengan eluen yang digunakan pada pemantauan dengan KLT. Mengapa? Jelaskan!

BAB V

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS 2 DIMENSI

(UJI KEMURNIAN)

URAIAN UMUM

KLT 2 dimensi memiliki prinsip yang sama dengan KLT biasa, hanya saja cara mengelusi dan tujuan dari KLT 2 dimensi ini berbeda dengan KLT biasa. KLT 2 dimensi dilakukan untuk tujuan uji kemurnian, yaitu melihat jumlah bercak yang dari isolat yang diperoleh. Plat KLT di elusi dua kali dengan fase gerak yang berbeda kepolarannya. Plat dikembangkan dua kali secara horizontal dan vertikal.

TUJUAN PERCOBAAN

1. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengetahui dan memahami prinsip-prinsip KLT dua dimensi.
2. Setelah mengikuti kegiatan pada praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat mengaplikasikan metode KLT dua dimensi dalam melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan/hewan. Untuk uji kemurnian senyawa murni/tunggal.

KEGUNAAN PERCOBAAN DALAM ILMU KEFARMASIAN

Dalam suatu proses isolasi senyawa kimia, setelah melalui tahapan-tahapan ekstraksi, fraksinasi dan separasi dengan berbagai macam teknik kromatografi. Hasil isolasi perlu dilakukan pembuktian atau konfirmasi untuk menyatakan kemurnian suatu isolat.

HUBUNGAN PERCOBAAN DENGAN MATERI KULIAH TEORI

Proses pembelajaran terkait metode kromatografi lapis tipis 2 dimensi pada praktikum ini diharapkan dapat meningkatkan pemahaman praktikan terkait materi metode pemisahan dengan kromatografi khususnya KLT 2 dimensi. Terutama tentang manfaat dan tujuan dari penggunaan teknik KLT 2 dimensi untuk pembuktian kemurnian suatu senyawa yang telah diisolasi.

CARA KERJA PERCOBAAN

Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada kegiatan praktikum ini adalah sebagai berikut:

- Gelas ukur
- Chamber/Staining jar
- Pipet volume
- Erlenmeyer
- Pipa kapiler
- Pipet tetes
- Botol semprot
- Lampu UV 254 dan 366 nm
- Dan lain sebagainya

2. Bahan

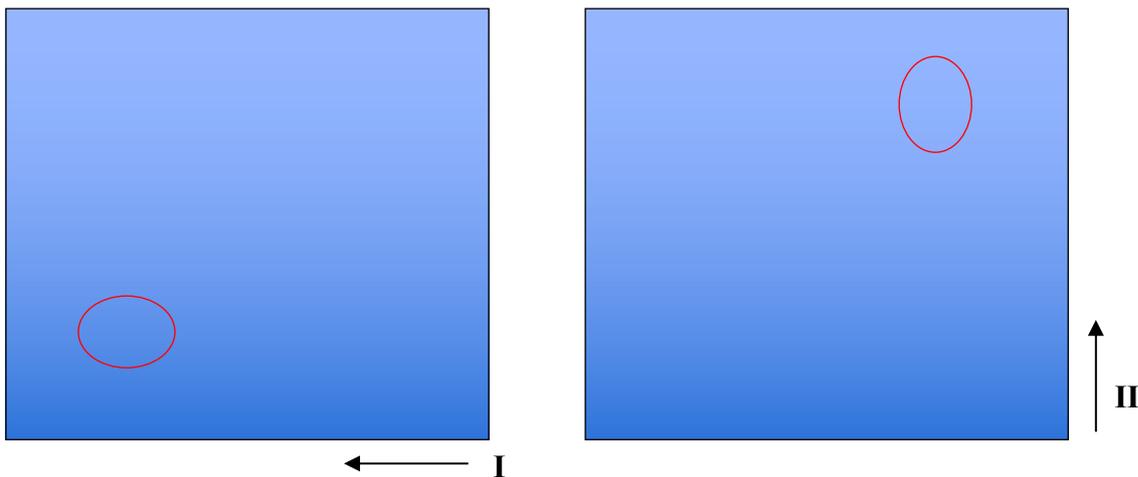
Bahan-bahan yang digunakan pada kegiatan praktikum ini adalah sebagai berikut:

- Ekstrak/fraksi ekstrak
- Plat KLT
- Metanol
- Kloroform
- N-Heksan
- Etil Asetat
- H₂SO₄ 10%

Cara Kerja

1. Cuplikan dilarutkan dengan pelarut yang sesuai. Kemudian ditotolkan pada plat KLT (10x10 cm).
2. Plat dikembangkan dengan pelarut/fase gerak yang bersifat kurang polar terlebih dahulu.
3. Setelah plat dikembangkan, plat dikeringkan dan diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm.
4. Selanjutnya plat dikembangkan kembali dengan fase gerak yang lebih polar dan sistem yang berbeda. Pengembangan plat yang kedua ini dilakukan dengan arah yang berbeda
5. Plat dikeringkan dan diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm.
6. Plat di semprot dengan penampak bercak H_2SO_4 10% dalam metanol.

Contoh KLT 2 dimensi:



SOAL-SOAL

1. Apa yang dimaksud dengan KLT 2 Dimensi?
2. Jelaskan prinsip dasar dari KLT 2 Dimensi!
3. Apa perbedaan dari KLT 2 dimensi dengan KLT dan KLTp? Jelaskan!
4. Mengapa pada eluen pada pengembangan 1 bersifat kurang polar dibanding eluen pada pengembangan 2? Jelaskan!
5. Apa tujuan dilakukannya KLT 2 Dimensi?
6. Pada proses uji kemurnian, mengapa plat KLT harus disemprot dengan H_2SO_4 10% ? Jelaskan!

BAB VI

PENENTUAN STRUKTUR ANALISIS INSTRUMEN

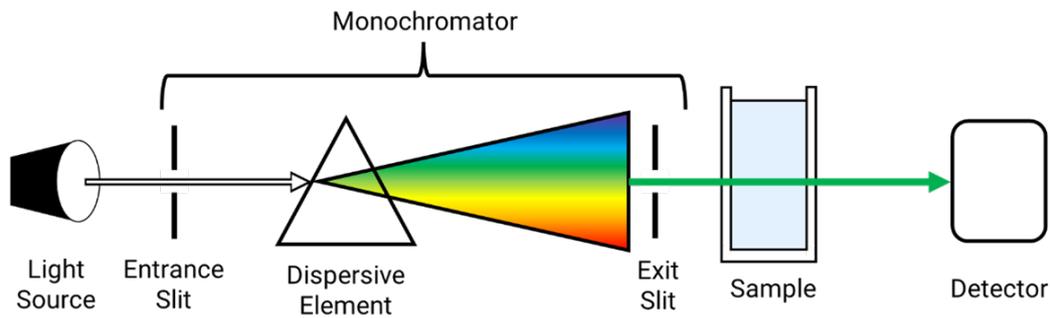
URAIAN UMUM

Spektrofotometri sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrofotometer dan fotometer. Spektrofotometer yang menghasilkan sinar spektrum dengan panjang gelombang yaitu dan fotometer adalah alat pengukuran intensitas cahaya ditransmisikan atau yang diabsorpsi.

Spektroskopi adalah ilmu yang mempelajari materi dan atributnya berdasarkan cahaya, suara atau partikel yang dipancarkan, diserap atau dipantulkan oleh materi tersebut. Spektroskopi juga dapat didefinisikan sebagai ilmu yang mempelajari interaksi antara cahaya dan materi. Metode spektroskopi inframerah merupakan suatu metode yang meliputi teknik serapan (absorption), teknik emisi (emission), teknik fluoresensi (fluorescence). Spektroskopi infra merah lebih diperuntukkan untuk menentukan adanya gugus-gugus fungsional utama dalam sampel yang diperoleh berdasarkan bilangan gelombang yang dibutuhkan untuk vibrasi

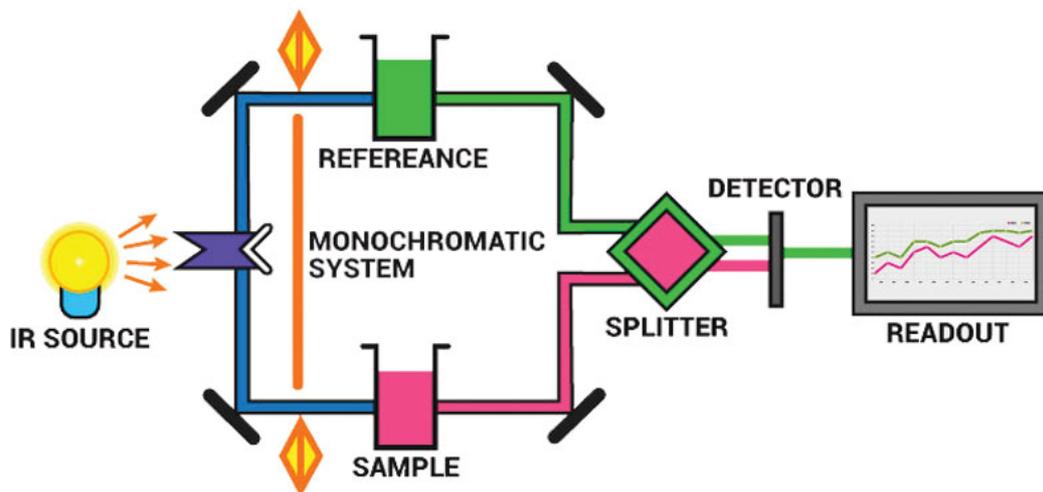
Seorang farmasis dituntut harus mampu mengidentifikasi obat-obat yang akan beredar di kalangan masyarakat, mengenai pengendalian kualitas dari bahan-bahan farmasi dan sediaan obat lainnya, sehingga yang nantinya akan menjamin keselamatan penggunaan obat, dalam hal itulah dilakukanlah analisis kuantitatif terhadap sediaan.

1. Spektroskopi Ultra Violet-Visibel (UV-Vis)



Untuk keperluan penentuan struktur, spektroskopi ultra violet memiliki kemampuan untuk mengukur jumlah ikatan rangkap atau konyugasiaromatik dalam suatu molekul. Daerah panjang gelombang dari spektrum ultra violet berkisar 200 - 400 nm. Penyerapan sinar ultra violet oleh suatu molekul akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik molekul tersebut. Transisi tersebut terjadi pada orbital ikatan atau pasangan elektron bebas dengan orbital anti ikatan. Sistem (gugus atom) yang menyebabkan terjadinya absorpsi cahaya disebut kromofor. Transisi elektronik yang mungkin terjadi secara teoritis diberikan pada gambar (Pavia et al, 2009).

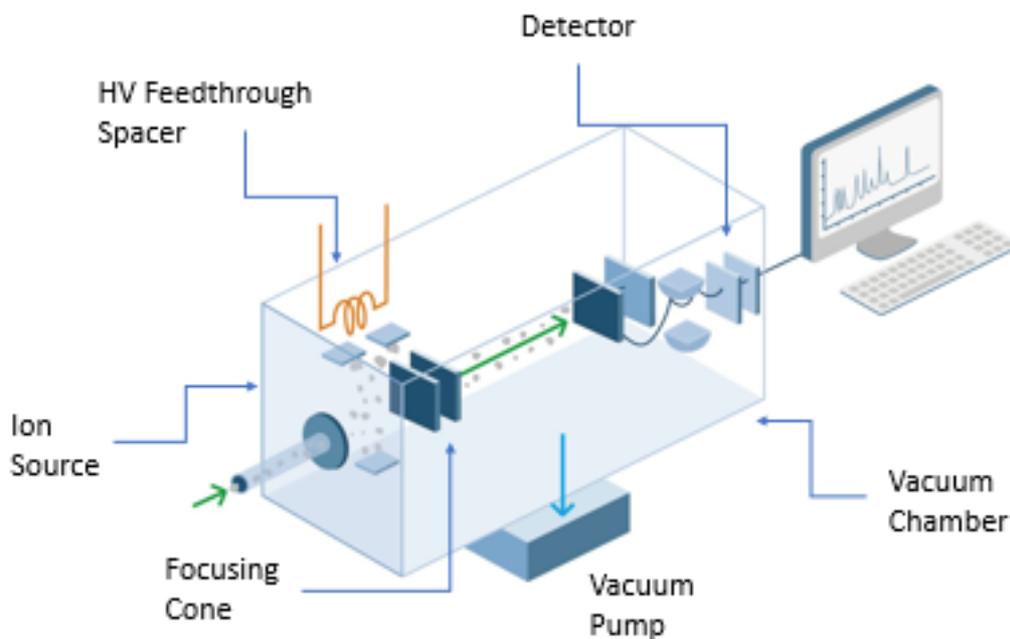
2. Spektroskopi Infrared (IR)



Spektrofotometri inframerah lebih banyak digunakan untuk identifikasi suatu senyawa melalui gugus fungsinya. Untuk keperluan elusidasi struktur, daerah dengan bilangan gelombang 1400 – 4000 cm^{-1} yang berada dibagian kiri spektrum IR, merupakan daerah yang khusus berguna untuk

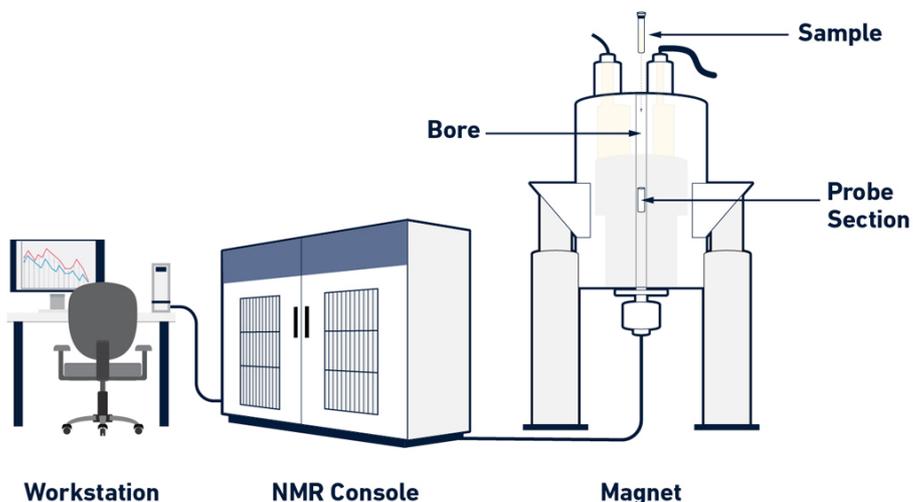
identifikasi gugusgugusfungsional, yang merupakan absorpsi dari vibrasi ulur. Selanjutnya daerah yang berada disebelah kanan bilangan gelombang 1400 cm^{-1} sering kali sangat rumit karena pada daerah ini terjadi absorpsi dari vibrasi ulur dan vibrasi tekuk, namun setiap senyawa organik memiliki absorpsi yang kharakteristik pada daerah ini. Oleh karena itu bagian spektrum ini disebut daerah sidikjari (fingerprint region). Saat ini ada dua macam instrumen yaitu spektroskopi IR dan FTIR (Furier Transformation Infra Red). FTIR lebih sensitif dan akurat misalkan dapat membedakan bentuk cis dan trans, ikatan rangkap terkonjugasi dan terisolasi dan lain-lain yang dalam spektrofotometer IR tidak dapat dibedakan (Sitorus, 2009).

3. Spektroskopi Massa (MS)



Suatu tehnik analisis berdasarkan pemisahan berkas ion-ion yang sesuai dengan perbandingan massa dengan muatan dan pengukuran intensitas dari berkas ion-ion tersebut. Spektroskopi massa (MS) akan melengkapi pelacakan struktur untuk suatu molekul yang belum diketahui BMnya. Spektroskopi massa akan 26 memberikan informasi harga BM (g/mol) dan bagaimana pola pemecahan (fragmentasi) dari suatu molekul organik (Sitorus, 2009).

4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)



Gambar Skema Instrumen NMR

a. Spektroskopi ^1H -NMR

Spektroskopi ^1H -NMR cukup banyak digunakan oleh kimiawan organik. Spektroskopi ini didasarkan pada kenyataan bahwa setiap kelompok proton (H) dalam molekul organik akan beresonansi pada frekuensi yang tidak identik atau beresonansi pada frekuensi spesifik. Hal ini disebabkan kelompok proton suatu molekul organik dikelilingi elektron yang berbeda (lingkungan elektroniknya berbeda). Makin besar kerapatan elektron yang mengelilingi inti maka makin besar pula medan magnet yang digunakan. Karena setiap atom H (proton) suatu molekul organik mempunyai lingkungan elektronik (kimia) yang berbeda maka akan menyebabkan frekuensi resonansi yang berbeda (Sitorus, 2009). Pergeseran kimia, dilambangkan dengan δ , menyatakan seberapa jauh (satuan ppm) proton tersebut digeser dari proton standar Tetrametilsilana (TMS) ($\delta = 0$ ppm), terhadap frekuensi spektrometer yang digunakan. Pada skala δ maka untuk TMS didefinisikan sebagai (0,0 ppm) dengan skala (0-10) ppm. Beberapa spektroskopi menggunakan skala τ yang besarnya adalah $(10 - \delta)$ ppm. Pada spektroskopi ^1H -NMR, maka skala δ dan τ dicatat dari kiri ke kanan pada kertas spektrum (Sitorus, 2009).

b. Spektroskopi karbon NMR (^{13}C -NMR)

Spektroskopi proton atau ^1H memberikan gambaran atom-atom hidrogen dalam sebuah molekul organik. Spektroskopi karbon-13 atau ^{13}C memberikan gambaran karbon-karbon dalam sebuah molekul organik. Spektra karbon-13 tidak digunakan meluas seperti spektra proton. Dalam

spektroskopi proton yang dilibatkan adalah isotop yang lazim dan alamiah dari hidrogen, 99,985% atom hidrogen adalah ^1H . Tetapi karbon-13 hanya 1,1% dari atom karbon yang terdapat di alam, karena 98,9% atom karbon adalah ^{12}C , suatu nukleotida yang tidak punya spin. Transisi inti ^{13}C dari keadaan paralel ke antiparalel hanyalah transisi berenergi rendah. Karena kelimpahannya di alam hanya 1,1% maka sensitifitas ^{13}C -NMR jauh lebih kecil dari ^1H yang mempunyai kelimpahan 99,98% di alam. Pergeseran kimia ^{13}C antara 0 sampai dengan 230 ppm yang terbagi atas sp^3 antara 0 – 60, alkohol 60 – 80 ppm, sp antara 70 – 80 ppm, sp^2 antara 100 – 160 ppm, gugus karbonil dari gugus karboksilat, ester, lakton, amida, anhidrida, antara 160-180 ppm sedangkan aldehyd antara 180 – 200 ppm dan keton antara 190 – 230 ppm. Bentuk sinyal dari gugus metil (CH_3) berbentuk quartet, metilen (CH_2) berbentuk triplet, metin berbentuk doublet sedangkan karbon kuarterner berbentuk singlet (Santoni, 2009).

TUJUAN PERCOBAAN

Adapun maksud percobaan ini yaitu untuk memahami elusidasi struktur senyawa bahan alam berdasarkan metode spektroskopi (UV, Massa, IR, HNMR dan CNMR)

KEGUNAAN PERCOBAAN DALAM ILMU KEFARMASIAN

Elusidasi struktur yang digunakan merupakan tahapan akhir dari hasil isolasi senyawa bahan alam. Identitas struktur di interpretasikan dari berbagai hasil spektrum dari tiap spektroskopi (UV, Massa, IR, HNMR dan CNMR)

HUBUNGAN PERCOBAAN DENGAN MATERI KULIAH TEORI

Proses pembelajaran terkait penentuan struktur kimia senyawa dengan interpretasi data spektrum terkait dari materi identifikasi senyawa maupun karakteristik senyawa.

V. SPEKTRUM

**(AKAN DIBERIKAN SAAT PRAKTIKUM DALAM BENTUK LEMBAR KERJA)*