

PENUNTUN PRAKTIKUM
PEMISAHAN DAN ANALISIS KIMIA

Oleh
TIM KIMIA



LABORATORIUM KIMIA FARMASI DAN MAKANAN
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS MULAWARMAN

SAMARINDA

2022

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirohim.

Alhamdu lilahi rabbil'alamina 'ala kuli halin wafi kulli halin wani'mah.

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah *Al-Álim* atas segala karunia dan nikmat terbaik yang telah diberikan kepada kami sehingga dapat menyusun buku penuntun praktikum pemisahan dan analisis kimia ini tepat pada waktunya.

Praktikum Pemisahan dan analisis Kimia diselenggarakan dengan tujuan untuk memudahkan pemahaman dan meningkatkan keterampilan mahasiswa dalam kerja laboratorium dan untuk menambah wawasan praktis bagi mahasiswa sebagai dasar dalam melakukan pemisahan bahan baku farmasi melalui proses ekstraksi, fraksinasi, isolasi dan karakterisasi suatu senyawa kimia yang terdapat dalam suatu sampel tertentu.

Dengan demikian pelaksanaan praktikum diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmu yang bermanfaat dan pengalaman kerja bagi mahasiswa, asisten, dan dosen pembimbing khususnya sebagai penunjang tugas akhir.

Penulisan Buku Penuntun Praktikum Pemisahan dan Analisis Kimia ini merupakan upaya optimal yang dilakukan untuk membantu pelaksanaan praktikum pemisahan dan analisis kimia, namun demikian masih diperlukan kritik dan saran yang membangun bagi penulis untuk penyempurnaan penulisan selanjutnya.

Mudah-mudahan buku penuntun yang sederhana ini dapat bermanfaat kepada para mahasiswa. Materi pada penuntun praktikum ini meliputi pemurnian pelarut, destilasi minyak atsiri, proses ekstraksi baik cara dingin maupun cara panas, kemudian dilengkapi dengan analisis kualitatif menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk mengetahui komposisi senyawa marker yang terdapat dalam suatu simplisia. Selain itu, analisis spektroskopi juga disajikan sebagai upaya mengkarakterisasi dan menentukan setruktur senyawa yang diperoleh selama proses isolasi. Analisis spektroskopi tersebut meliputi analisis spektro UV-Vis, FTIR, MS, NMR 1 dan 2D.

Pada kesempatan ini kami ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan penuntun ini, semoga segala usaha kita dinilai ibadah oleh Allah Allah *Al-Álim* Yang Maha Mengetahui dan Berilmu.

Penulis

TATA TERTIB PRAKTIKUM

1. Berdoa sebelum dan sesudah melaksanakan praktikum.
2. Setiap peserta praktikum harus hadir tepat waktu sesuai dengan yang ditentukan. Keterlambatan lebih dari 5 menit dari waktu yang telah ditentukan dapat mengakibatkan ditolaknya peserta untuk mengikuti praktikum pada hari yang bersangkutan.
3. Selama mengikuti praktikum, peserta diwajibkan mengenakan jas laboratorium berwarna putih yang bersih.
4. Setiap peserta praktikum bertanggung jawab pada ketertiban dan kebersihan laboratorium. Selama mengikuti praktikum, peserta wajib berlaku sopan baik cara berkomunikasi, maupun mode pakaian yang digunakan dan tidak bersenda gurau.
5. Setiap peserta praktikum harus selalu berhati-hati dan memperhatikan tentang kemungkinan kontaminasi reagensia ke dalam botol dan sedapat mungkin dihindari. Tutuplah segera botol reagensia dan perhatikan agar tutup botol reagensia tersebut tidak tertukar dengan tutup botol reagensia yang lain.
6. Pretest di awal praktikum atau posttest diakhir praktikum dilakukan selama kurang lebih 15-20 menit.
7. Setelah menyelesaikan suatu acara praktikum, setiap peserta harus mengembalikan semua peralatan yang digunakan dalam keadaan bersih dan kering ke tempat semula. Kerusakan peralatan yang terjadi selama praktikum menjadi tanggung jawab peserta.
8. Setelah menyelesaikan suatu acara praktikum, setiap peserta diwajibkan membuat laporan praktikum berupa :
 - a. Laporan sementara, yang dibuat di laboratorium sesaat setelah suatu acara praktikum diselesaikan dan harus mendapatkan pengesahan pembimbing praktikum.
 - b. Laporan resmi, yang dibuat di luar laboratorium dan harus diserahkan kepada pembimbing sebelum mengikuti acara praktikum berikutnya.
9. Seluruh kegiatan praktikum akan diakhiri dengan responsi, nilai akhir

praktikum akan ditentukan berdasarkan pada prestasi peserta selama mengikuti praktikum, yang meliputi pretest atau posttest, nilai praktikum, nilai laporan dan ujian akhir.

10. Hal-hal yang belum tertuang dalam peraturan tata tertib ini akan diatur lebih lanjut.

DAFTAR ISI

PERCOBAAN I

PEMURNIAN PELARUT

Tujuan : Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat

1. Memahami prinsip kerja destilasi sederhana.
2. Memahami manfa'at destilasi, khususnya dalam analisis farmasi.
3. Memahami cara karakterisasi dan penetapan kadar etanol.

Dasar Teori

Destilasi merupakan metode yang sangat baik untuk memurnikan zat cair. Suatu zat cair mengandung atom-atom atau molekul yang tersusun berdekatan namun masih dapat bergerak bebas dengan energi yang berlainan. Ketika suatu molekul zat cair mendekati perbatasan fasa uap- cair, maka molekul tersebut, jika memiliki energi yang cukup, dapat berubah dari fasa cair menjadi fasa gas. Hanya molekul-molekul yang memiliki energetika yang cukup yang dapat mengatasi gaya yang mengikat antarmolekul dalam fasa cair sehingga dapat melepaskan diri ke dalam fasa gas.

Beberapa molekul yang berada dalam fasa uap di atas zat cair, ketika mendekati permukaan zat cair tersebut, dapat memasuki fasa cair kembali sehingga menjadi bagian dari fasa yang terkondensasi. Pada saat proses ini terjadi, molekul-molekul tersebut memperkecil energi kinetiknya, sehingga gerakannya lebih lambat. Pemanasan terhadap zat cair menyebabkan banyak molekul memasuki fasa uap; proses pendinginan uap merupakan kebalikan dari proses ini.

Ketika sistem berada dalam kesetimbangan, karena banyak molekul zat cair yang memasuki fasa uap dan kemudian kembali lagi dari fasa uap menjadi cair, maka dapat terukur tekanan uapnya. Jika sistem tetap bertahan dalam kesetimbangan, bahkan ketika energinya dinaikkan, banyak molekul dalam fasa cair akan memiliki energi yang mencukupi untuk berubah menjadi fasa uap. Walaupun banyak molekul yang juga kembali dari fasa uap ke dalam fasa cair, namun jumlah molekul dalam fasa uap bertambah dan tekanan uap akan naik.

Jumlah molekul dalam fasa uap sangat bergantung pada suhu, tekanan dan kekuatan gaya tarik antarmolekul di dalam fasa cair dan volume sistem.

Jika dua komponen berbeda (**A** dan **B**) terdapat dalam fasa cair, uap di atas permukaan fasa cair akan mengandung beberapa molekul setiap komponen. Jumlah molekul **A** dalam fasa uap akan ditentukan oleh tekanan uap **A** dan fraksi mol **A** dalam campuran. Dengan kata lain, jumlah relatif komponen **A** dan **B** dalam fasa uap akan berhubungan erat dengan tekanan uap tiap zat cair murni. Hubungan ini secara matematis diungkapkan menurut hukum Raoult:

$$P_{\text{total}} = P_A + P_B, \text{ dimana } P_A = P_A^\circ X_A \text{ dan } P_B = P_B^\circ X_B$$

$$P_A = \text{tekanan parsial A} \quad P_B = \text{tekanan parsial B}$$

$$P_A^\circ = \text{tekanan uap murni A} \quad P_B^\circ = \text{tekanan uap murni B}$$

$$X_A = \text{fraksi mol A dalam fasa cair} \quad X_B = \text{fraksi mol B dalam fasa cair}$$

Tekanan uap total di atas permukaan campuran zat cair adalah penjumlahan kedua tekanan parsial antara komponen A dan B. Ketika suhu naik, tekanan uap masing-masing komponen bertambah, sehingga secara proporsional meningkatkan tekanan uap total di atas permukaan campuran cair. Pada beberapa suhu, jumlah tekanan parsial sama dengan 760 torr (1 atm) dan pada saat ini larutan mulai mendidih. Secara umum, **Titik Didih** didefinisikan sebagai suhu ketika jumlah tekanan parsial di atas fasa cair sama dengan tekanan luar yang dikenakan pada sistem. Penurunan tekanan luar menyebabkan larutan akan mendidih pada suhu lebih rendah – penaikan tekanan luar menyebabkan larutan akan mendidih pada suhu lebih tinggi. Hukum Raoult juga memberikan informasi tentang komposisi fasa uap di atas permukaan zat cair:

$$\begin{aligned} X'_A &= \text{fraksi mol A dalam} \\ &\text{fasa uap} = P_A/P_{\text{total}} \quad X'_B = \\ &\text{fraksi mol B dalam fasa uap} \\ &= P_B/P_{\text{total}} \end{aligned}$$

Ilustrasi teori dasar distilasi berdasarkan hukum Raoult dan hukum Dalton tentang tekanan parsial adalah sebagai berikut:

Alat dan Bahan

ALAT – ALAT

- 1 set alat destilasi
- *Thermometer* 110⁰C
- Statif dan klem
- Heating Mantle
- Alcoholmeter
- Batang pengaduk
- Erlenmeyer
- Corong pisah

BAHAN-BAHAN

- Etanol
- Aquades
- Vaseline

Prosedur Percobaan

1. Rakit satu set alat destilasi lengkap
2. Masukkan batu didik kedalam labu destilasi
3. Masukkan pelarut etanol yang telah diukur kadar alkoholnya menggunakan alcoholmeter.
4. Didihkan dengan suhu konstan (70-75° C) hingga menguap dan terkondensasi
5. Pelarut yang dihasilkan kemudian diukur kembali kadar alkoholnya.
6. Buatlah tabel hasil pengukuran dengan proses pengulangan

PERCOBAAN II

DESTILASI MINYAK ATSIRI

Tujuan : Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat

1. Memahami manfa'at destilasi uap, khususnya dalam analisis kandungan minyak atsiri.
2. Memahami cara penguapan minyak atsiri.

Dasar Teori

Destilasi uap adalah metode yang populer untuk ekstraksi minyak-minyak menguap (minyak essensial) dari sampel tanaman. Prinsip dasarnya adalah mencampur bahan dengan air kemudian dipanaskan hingga mendidih. Uap yang timbul dikumpulkan dan dibiarkan mengembun, dan minyak akan terpisah dan air (destilasi dengan air). Jika minyak yang akan didestilasi harus dihindarkan dari pemanasan yang berlebihan, maka uap dan generator (wadah berisi air) dibuat hanya melewati sampel yang disuspensikan dalam air tetapi dipanaskan (destilasi uap air).

Destilasi uap berpegang pada prinsip fisik yaitu, jika dua cairan tidak bercampur digabungkan, tiap cairan bertindak seolah-olah pelarut itu hanya sendiri, dan menggunakan tekanan uap. Tekanan uap total dari cairan yang mendidih sama dengan jumlah tekanan uap parsial, yaitu tekanan yang digunakan oleh komponen tunggal. Karena pendidihan yang dimaksud yaitu tekanan uap total sama dengan tekanan atmosfer, titik didih dicapai pada temperatur lebih rendah dibandingkan jika tiap-tiap cairan berada dalam keadaan murni.

Perhatian : destilasi uap tidak dapat digunakan bila sampel mengandung senyawa yang mudah terhidrolisis dengan panas seperti ester atau bahan yang mudah teroksidasi atau terurai.

Alat dan Bahan

ALAT – ALAT

- 1 set alat destilasi
- *Thermometer* 110⁰C

- Statif dan klem
- Heating Mantle
- Alcoholmeter
- Batang pengaduk
- Erlenmeyer
- Corong pisah

BAHAN-BAHAN

- Simplisia (Kulit Jeruk)
- Aquades
- Vaselin

Prosedur Percobaan

1. Siapkan Seperangkap Alat Destilasi.
2. Ekstrak metanol yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam labu destilasi, tutup kembali
3. Panaskan Labu destilasi dalam elektromantel dan jalankan air pendingin dalam kondensor.
4. Pelarut metanol akan terpisah dari ekstrak ke dalam labu penampung hingga ekstrak mengental.
5. Dipindahkan dan dimasukkan ekstrak metanol kental ke dalam botol.
6. Dipanaskan kembali ekstrak kental yang diperoleh dengan memanaskannya di atas penangas hingga diperoleh ekstrak kering, kemudian dinginkan.

PERCOBAAN III

EKSTRAKSI (REFLUK)

Tujuan : Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat:

1. Mengetahui dan memahami teknik ekstraksi dengan alat refluks.
2. Mengetahui dan memahami tujuan dan fungsi penggunaan alat refluks.

Dasar Teori

Prinsip dasar penyarian dengan metode Refluks adalah Sampel yang akan diekstraksi diletakkan dalam labu alas bulat bersama dengan cairan penyari yang akan digunakan. Cairan penyari dipanaskan hingga mendidih. Uap penyari mengalami kondensasi (pengembunan) oleh pendingin balik embun yang terbentuk kemudian turun kembali ke labu sambil melarutkan zat aktif. Proses semacam ini berlangsung secara terus menerus (berulang) hingga proses ekstraksi sempurna.

Persyaratan sampel yang dapat diekstraksi dengan metode ini adalah sampel bertekstur keras (batang, biji, kulit, buah); tahan terhadap pemanasan. Metode ini memiliki keterbatasan, salah satu masalahnya yaitu pelarutnya didaur ulang sehingga ekstrak yang terkumpul pada wadah terus-menerus dipanaskan dan dapat berakibat terjadi reaksi peruraian ekstrak yang disebabkan oleh panas

Alat dan Bahan

Alat

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

- Gelas ukur
- Kondensor
- Waterbath
- Labu alas bulat
- Blender kering
- Rotavapor
- Penangas
- Pisau pemotong simplisia
- Desikator
- Mangkok/Wadah penampung ekstrak
- Dan lain-lain

2. Bahan

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

- Pelarut organik (ditentukan oleh asisten)
- Simplisia (ditentukan oleh asisten)
- Aquades
- Dan lain-lain

Prosedur Percobaan

1. Siapkan alat dan bahan
2. Rangkai alat kaca menjadi seperangkat alat ekstraksi secara refluks
3. Simplisia kering dipotong kecil-kecil, sehingga menjadi dalam bentuk haksel
4. Haksel simplisia dimasukkan kedalam labu alas bulat yang dirangkai
5. Masukkan pelarut yang sesuai
6. Nyalakan penangas, atur suhu sesuai dengan sifat pelarut
7. Biarkan selama sekitar 2-3 jam
8. Setelah itu, keluarkan pelarut dari dalam labu ukur yang tertampung
9. Uapkan larutan ekstrak dengan menggunakan evaporator atau waterbath
10. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali.
11. Hitung rendemen ekstrak.

SOAL-SOAL

- 1) Apa yang dimaksud dengan ekstraksi?
- 2) Apa tujuan dari ekstraksi?
- 3) Jelaskan tujuan penyerbukan simplisia!
- 4) Sebutkan jenis-jenis metode ekstraksi! Jelaskan!
- 5) Jelaskan cara pemilihan metode ekstraksi suatu sampel!
- 6) Mengapa perlu dilakukan proses remaserasi?
- 7) Pada metode ekstraksi dengan cara sokhletasi dan reflaks tidak ditambahkan pelarut baru. Jelaskan!
- 8) Apa yang dimaksud dengan rendemen?
- 9) Jelaskan tujuan perhitungan rendemen!
- 10) Apa yang anda ketahui tentang senyawa artefak? Jelaskan!

PERCOBAAN IV

EKSTRAKSI (SOKLET)

Tujuan :

1. Mengetahui dan memahami teknik ekstraksi dengan alat soklet.
2. Mengetahui dan memahami tujuan dan fungsi penggunaan alat soklet.

Dasar Teori

Prinsip dasar metode adalah cairan penyari dipanaskan, uap cairan penyari akan naik ke atas melalui pipa samping naik ke kondensator, uap pengembun dan menetes ke dalam kelongsong (thimble) berisi sampel yang diekstraksi. Ketika cairan penyari mencapai ketinggian ujung sifon, seluruh cairan dalam kelongsong akan mengalir melalui sifon dan kembali ke wadah labu alas bulat. Cara ini lebih menguntungkan karena panas tidak melalui serbuk simplisia, tetapi melalui pipa samping.

Sistem soklet itu terdiri dari 3 bagian :

1. Bagian bawah, berupa labu berisi penyari yang dipanaskan dan uapnya menuju ke bagian atas (lewat pipa samping dari bagian tengah).
2. Bagian atas, berupa pipa pendingin tegak, fungsinya untuk mengembunkan uap penyari yang dikirim dari labu.
3. Bagian tengah, berisi serbuk simplisia yang menerima tetesan penyari dari
4. pendingin di atasnya, bertetes-tetes sampai pada batas tertentu, cairan penyari nanti akan bergulir kembali ke dalam labu bawah sambil membawa zat aktif yang telah tersari.

Proses ini akan terjadi berulang-ulang sampai penyarian dianggap selesai apabila cairan yang bersirkulasi telah bening atau tidak lagi mengandung zat aktif (dibuktikan dengan reaksi kimia). Kelemahannya : ekstrak yang didapat selalu terkena panas dalam labu.

Persyaratan sampel yang dapat diekstraksi dengan metode ini adalah sampel harus diserbukkan terlebih dahulu, sampel bertekstur lunak. Metode ini memiliki keterbatasan antara lain: pelarut diaur ulang, ekstrak cenderung mengalami peruraian akibat panas, jumlah total senyawa yang diekstraksi akan melampaui kelarutannya dalam pelarut sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat mengendap dalam wadah sehingga membutuhkan volume pelarut yang lebih banyak untuk melarutkannya, tidak dapat digunakan pelarut campuran

untuk mengekstraksi sampel (contoh: hexan: diklorometan), atau pelarut yang diasamkan/dibasakan karena uapnya akan memiliki komposisi yang berbeda dalam pelarut cair di dalam wadah.

Alat dan Bahan

1. Alat

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

- Gelas ukur
- Kondensor
- Waterbath
- Labu alas bulat
- Kolom Sokhlet
- Blender kering
- Rotavapor
- Penangas
- Pisau pemotong simplisia
- Desikator
- Mangkok/Wadah penampung ekstrak
- Dan lain-lain

2. Bahan

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

- Pelarut organik (ditentukan oleh asisten)
- Simplisia (ditentukan oleh asisten)
- Aquades
- Dan lain-lain

Prosedur Percobaan

1. Siapkan alat dan bahan
2. Rangkai alat kaca menjadi seperangkat alat ekstraksi secara sokhlet
3. Simplisia kering dipotong kecil-kecil, kemudian di blender/dihaluskan menjadi serbuk.
4. Serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring lalu dimasukkan kedalam kelongsong tabung sokhlet.

5. Masukkan pelarut yang sesuai
6. Nyalakan penangas, atur suhu sesuai dengan sifat pelarut
7. Hitung waktu yang dibutuhkan untuk satu siklus.
8. Setelah 10-20 siklus, keluarkan pelarut dari dalam labu ukur yang tertampung
9. Uapkan larutan ekstrak dengan menggunakan evaporator atau waterbath
10. Hitung rendemen ekstrak.

PERCOBAAN V

PENENTUAN KOEFISIEN DISTRIBUSI (FRAKSINASI)

Tujuan : Setelah mengikuti praktikum ini mahasiswa diharapkan dapat mengetahui dan memahami prosedur fraksinasi secara cair-cair

Dasar Teori

Fraksinasi merupakan suatu proses yang bertujuan memisahkan komponen kimia dari suatu ekstrak menjadi fraksi-fraksi yang lebih spesifik, misalnya berdasarkan kepolarannya, sifat asam basa dan lain sebagainya. Metode-metode yang digunakan untuk fraksinasi atau pemurnian adalah sebagai berikut :

1. Pengendapan
2. Ekstraksi Cair-cair
3. Destilasi
4. Dialisis, dan
5. Prosedur Kromatografi.

Pemilihan Metode fraksinasi yang digunakan dalam situasi tertentu bergantung pada beberapa faktor antara lain :

1. Sifat senyawa yang terdapat dalam ekstrak

Faktor ini adalah hal yang paling penting untuk dipertimbangkan. kecuali uji kimia pendahuluan yang telah dilakukan. pengetahuan mengenai hal ini biasanya hanya mengenai perkiraan kelarutan komponen yang didasarkan pada tipe pelarut yang digunakan untuk ekstrak. oleh karena itu jika digunakan air sebagai pengekstraksi, komponen yang terekstraksi akan bersifat polar, termasuk senyawa yang bermuatan listrik. dilain pihak jika digunakan pelarut non polar maka senyaw-senyawa yang terekstraksi bersifat non polar dalam ekstrak yang diperoleh.

2. Nasib Awal fraksi yang dipisahkan

Jika fraksi akan digunakan untuk uji biologi, bahan-bahan toksik harus dihindari selama proses fraksinasi dan fraksi harus dilarutkan dalam pelarut yang dapat bercampur dengan sistim uji. pelarut air adalah pilihan utama. aspek toksisitas kurang penting jika fraksi akan digunakan untuk prosedur fraksinasi selanjutnya, atau jika untuk diisolasi senyawa tunggal.

3. Ketersediaan dan harga peralatan serta bahan yang akan digunakan.

4. Keamanan

Kebanyakan variasi penggunaan bahan kimia menyebabkan resiko yang besar, resiko tersebut mungkin efek samping akut atau kronik bagi kesehatan akibat toksisitas bahan atau mungkin bahaya bahan yang disebabkan oleh beberapa faktor lain seperti nyala api atau korosi. oleh sebab itu teknik dan bahan yang dipilih harus selalu berusaha mengurangi resiko ini seminimal mungkin, misalnya pemilihan pelarut yang tidak mudah terbakar selalu digunakan daripada pelarut yang mudah terbakar.

Alat dan Bahan

Alat

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

- Corong pisah
- Gelas kimia
- Erlenmeyer
- Erlenmeyer vakum
- Magnetik stirer
- Penangas
- Sentrifuge
- Dan peralatan sederhana lainnya

Bahan

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

- Metanol
- Etil asetat
- Kloroform
- Petroleum eter
- Etanol
- N-heksan
- Aquades
- Kertas saring
- Ekstrak
- Dan lain-lain

Prosedur Percobaan

1. Ditimbang ekstrak kering Sampel kurang lebih 3-5 gram, kemudian ditambah dengan 50 ml air, dilarutkan dan disaring menggunakan kertas saring
2. Dimasukkan campuran air dan ekstrak ke dalam corong pisah dengan keran dalam keadaan tertutup kemudian ditambahkan dengan n-hexan sebanyak 50 ml
3. Ditutup lalu dikocok kuat sambil sesekali membuka keran dalam keadaan terbalik untuk membuang gas yang bertekanan
4. Didiamkan, maka akan membentuk 2 lapisan (air berada dibawah larutan n-hexan)
5. Dimasukkan ekstrak air yang berada dibawah kedalam labu Erlenmeyer dengan membuka keran.
6. Dimasukkan ekstrak n-hexan kedalam botol selai
 1. Diulangi prosedur no.2-6 dengan menggunakan ekstrak air sebanyak 3 kali
 2. Ditampung seluruh ekstrak n-hexan kedalam botol dan diberi label
 3. Dilakukan pemekatan terhadap hasil ekstrak
 4. Diulangi prosedur terhadap ekstrak air hasil fraksinasi dengan pelarut n-hexan
 5. Diulangi prosedur terhadap ekstrak air hasil fraksinasi dengan cairan etil asetat
 6. Diulangi prosedur terhadap ekstrak air hasil fraksinasi dengan menggunakan pelarut n-butanol
7. Dimasukkan masing-masing fraksi yang telah kering secukupnya ke dalam botol fial lalu diberi etiket

SOAL-SOAL

1. Apakah yang dimaksud dengan fraksinasi?
2. Jelaskan tujuan dilakukannya fraksinasi!
3. Jelaskan perbedaan dari Ekstraksi dan Fraksinasi!
4. Sebutkan metode-metode fraksinasi yang anda ketahui! Jelaskan!
5. Jelaskan perbedaan metode-metode fraksinasi tersebut!
6. Jelaskan keuntungan dan kerugian dari metode-metode fraksinasi!
7. Mengapa pelarut yang digunakan pada Ekstraksi Cair-Cair dimulai dari pelarut yang bersifat non polar hingga polar? Jelaskan!

PERCOBAAN VI

ANALISIS SENYAWA DALAM EKSTRAK

Tujuan : Setelah mengikuti kegiatan praktikum ini diharapkan mahasiswa dapat

1. Mengetahui dan memahami teknik-teknik kromatografi lapis tipis.
2. Mengaplikasikan prinsip-prinsip kromatografi lapis tipis dalam menganalisis atau mengidentifikasi senyawa-senyawa/ metabolit sekunder yang terdapat pada sampel

Dasar Teori

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 dengankromatografi kolom. demikian juga peralatannya.

Beberapa keuntungan lain kromatografi planar :

1. KLT banyak digunakan untuk tujuan analisis.
2. Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet.
3. Dapat dilakukan elusi secara menaik (*Ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi dua dimensi.
4. 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.

Penyerap 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
- Pembaceman 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.

Alat dan Bahan

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

1. Gelas ukur
2. Chamber/Staining jar
3. Pipet volume
4. Erlenmeyer
5. Pipa kapiler
6. Pipet tetes

7. Botol semprot
8. Lampu UV 254 dan 366 nm

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 MS

Prosedur Percobaan

Buat eluen masing-masing sebanyak 50 ml dengan prosedur sebagai berikut:

- i. 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
 - ii. Pada eluen n-hexan/etil asetat dan kloroform/metanol langsung dicampur sesuai dengan perbandingannya masing-masing perlahan-lahan
 - iii. Kocoklah hingga diperoleh larutan bening lalu dimasukkan kedalam botol, diberi label
 - iv. Pada eluen kloroform/metanol/air, Masukkan air terlebih dahulu lalu Masukkan setengah metanol sambil diguncang
 - v. 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 H_2SO_4 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 Rf?
- 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 H₂SO₄ 10% dalam metanol pada plat KLT!
- 12) Hal apa yang membedakan analisis metabolit sekunder menggunakan KLT dengan pereaksi tetes? Jelaskan!