

METODE PRAKTIS
ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU



Dr. Ir. Enih Rosamah, M.Sc., lahir di Sumedang pada tanggal 17 Agustus 1966. Ia menyelesaikan program Sarjana (S1) di Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor (lulus Th 1990), Pendidikan Magister Science (M.Sc.for.trof.) ditempuh di Georg-August Universität Göttingen, Jerman (lulus Th 1997). Dan terakhir menempuh jenjang Pendidikan Doktor (S3) di Georg-August Universität Göttingen, Jerman (lulus Tahun 2003), dengan bidang keahlian Teknologi Hasil Hutan, khususnya Kimia Kayu (tumbuhan berkayu).

Sejak tahun 1991 hingga sekarang bekerja sebagai dosen pada Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman Samarinda, Kalimantan Timur.



Penerbit Deepublish (CV BUDI UTAMA)
Jl. Rajawali, Gang Elang 6 No.3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman
Jl. Kaliurang Km 9,3 Yogyakarta 55581
Telp/Fax : (0274) 4533427
Anggota IKAPI (076/DIY/2012)
cs@deepublish.co.id @penerbitbuku_deepublish
Penerbit Deepublish www.penerbitbukudeepublish.com

Kategori :



METODE PRAKTIS

ANALISIS KIMIA TUMBUHAN BERKAYU

Dr. Ir. Enih Rosamah, M.Sc.



METODE PRAKTIS
ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

Dr. Ir. Enih Rosamah, M.Sc.

METODE PRAKTIS
ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

Dr. Ir. Enih Rosamah, M.Sc.

Metode Praktis
ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

deepublish / publisher

UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

Pembatasan Pelindungan Pasal 26

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. Penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

Dr. Ir. Enih Rosamah, M.Sc.

Metode Praktis
ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

METODE PRAKTIS ANALISIS KIMIA TUMBUHAN BERKAYU

Enih Rosamah

Desain Cover :
Dwi Novidiantoko

Sumber :
www.freepik.com

Tata Letak :
Amira Dzatin Nabila

Proofreader :
Avinda Yuda Wati

Ukuran :
x, 55 hlm, Uk: 14x20 cm

ISBN :
No ISBN

Cetakan Pertama :
Bulan 2020

Hak Cipta 2020, Pada Penulis

Isi diluar tanggung jawab percetakan

Copyright © 2020 by Deepublish Publisher
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

PENERBIT DEEPUBLISH
(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)
Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman
Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581
Telp/Faks: (0274) 4533427
Website: www.deepublish.co.id
www.penerbitdeepublish.com
E-mail: cs@deepublish.co.id

Acknowledgment
Terima Kasih
Kepada

DIREKTORAT KARIER DAN KOMPETENSI SDM
DIREKTORAT JENDERAL SUMBER DAYA IPTEK
DAN PENDIDIKAN TINGGI

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN
TINGGI

PROGRAM DOSEN MERENUNG 2019
No Kontrak: T/128/D2.3/KK.04.03/2019
Tanggal 27 September 2019

Bukui ini didedikasikan kepada:
Prof. Dr. Maruli Humala Simatupang

PENGANTAR

Penulis mengucapkan Puji dan syukur ke Hadirat Allah SWT, atas berkat dan karunia-Nya, tersusun buku tipis tentang metode praktis untuk menganalisis kimia hasil hutan, terutama tumbuhan berkayu. Buku ini dapat digunakan dan dipahami dengan mudah, sehingga diperuntukkan bagi pemula maupun yang sudah terbiasa bekerja di Laboratorium Kimia Hasil Hutan. Penulis merasa terpanggil untuk menyusun tulisan ini, dan berharap baik bagi mahasiswa, laboran, maupun peneliti di laboratorium, dapat lebih memahami metode analisis kimia hasil hutan, terutama kelompok tumbuhan berkayu secara mudah dan akurat. Sehingga diharapkan para mahasiswa, laboran, maupun bagi peneliti di laboratorium kimia dapat lebih mudah memahami mengenai dasar-dasar teknik analisis kimia, baik dari segi teori maupun praktik. Buku tipis ini berisi penjelasan mengenai teori singkat tentang komponen kimia kayu dan contoh langkah-langkah praktis dalam hal metode analisa kimia, sehingga akan lebih mudah dipahami dan dipraktikkan sendiri. Semoga kiranya tulisan singkat ini memberi manfaat bagi yang memerlukan dan mendapat Ridho Allah SWT. Aamiin.

Penulis

DAFTAR ISI

PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
1. PENDAHULUAN	1
2. PENENTUAN KANDUNGAN EKSTRAKTIF (TAPPI T 6 M – 59)	3
3. PROSEDUR PENENTUAN EKSTRAKTIF	7
3.1. Pengekstrakan (Ekstraksi)	7
3.2. Analisis Bahan Ekstraktif	8
3.2.1. Kromatografi Lapisan Tipis (KLT)	11
4. PENENTUAN KANDUNGAN HOLOSELULOSA	16
4.1. Dasar-Dasar Reaksi	16
4.2. Metode Penentuan	16
4.3. Peralatan yang Diperlukan	18
4.4. Bahan Kimia	18
4.5. Metode Penentuan	18
4.6. Peralatan	19
4.7. Bahan Kimia	19
5. PENENTUAN KANDUNGAN SELULOSA MENURUT CROSS-BEVAN	20
6. PENENTUAN KANDUNGAN LIGNIN (LIGNIN KLASON)	21
6.1. Dasar dan Metode Penentuan	21

6.2.	Metode Penentuan.....	21
6.3.	Peralatan.....	23
6.4.	Bahan Kimia.....	24
7.	PERTANYAAN-PERTANYAAN DAN LAPORAN.....	25
8.	CONTOH ANALISIS BAHAN EKSTRAKTIF DARI KAYU JATI.....	27
8.1.	Pendahuluan.....	27
8.2.	Pengekstrakan (Ekstraksi) dan Pemisahan.....	27
8.2.1.	Pengekstrakan dengan Petroleter.....	27
	8.2.1.1. Senyawa yang Larut dalam Natrium Karbonat.....	29
	8.2.1.2. Senyawa yang Larut dalam Natrium Hidroksida Akuatik.....	31
	8.2.1.3. Senyawa-Senyawa Netral.....	32
8.2.2.	Pengekstrakan dengan Etil Eter.....	33
8.2.3.	Pengekstrakan dengan Aseton/Air (9:1) dan Etanol/Air (8:2).....	34
8.2.4.	Pengekstrakan dengan Air.....	36
8.2.5.	Penyulingan dengan Uap Panas (<i>Steam</i>).....	36
9.	UJI WARNA PADA KLT (TLC).....	39
9.1.	Pendahuluan.....	39
9.2.	Uji Warna Umum Berdasarkan pada Adsorpsi Iodin.....	40
9.3.	Uji Warna Umum Berdasarkan Oksidasi.....	41
9.4.	Uji Warna Gugus Karbonil.....	42
9.5.	Uji Warna Gugus Karboksil.....	42
9.6.	Uji Warna Gugus Fenol.....	43
9.7.	Uji Warna Karbohidrat atau Sakarida.....	43

9.8. Uji Warna Asam Amino.....	44
10. MEMILIH FASE MOBIL DALAM KLT.....	45
11. DOKUMENTASI DALAM KLT	47
REFERENSI.....	54
TENTANG PENULIS	55

deepublish / publisher

1.

PENDAHULUAN

Kayu merupakan bahan baku untuk berbagai industri. Ada industri kayu yang menggunakan kayu dalam bentuk tidak berubah, artinya kayu dikerjakan dan dijadikan barang-barang keperluan sehari-hari atau menjadi bahan konstruksi. Di samping itu ada juga industri yang mengolah kayu tersebut, sehingga bangun dan susunan semula tidak terlihat lagi pada hasil yang diperoleh.

Sifat-sifat kayu meliputi sifat fisika umpamanya berat jenis, yang terutama menentukan keteguhan dan sifat-sifat mekanis lainnya; sifat-sifat kimia, misalnya kadar selulosa, kadar lignin dan kadar hemiselulosa serta susunan kimia bahan ekstraktif. Untuk keperluan pemanfaatan industri pengolahan kayu, penting untuk mengetahui sifat-sifat kimia kayu yang dimanfaatkannya.

Kayu terdiri dari selulosa (37-52%), hemiselulosa (14-39%), lignin (18-37%) dan ekstraktif (1-30%). Ekstraktif ialah senyawa-senyawa dalam kayu yang dapat dipisahkan dengan bahan pelarut netral. Holoselulosa adalah jumlah selulosa dan hemiselulosa. Kandungan setiap komponen dalam kayu bukan hanya dipengaruhi oleh jenis kayu, tetapi dalam satu jenis dan malahan dalam satu jaringan kandungan ini bisa bervariasi. Senyawa anorganik juga terdapat dalam kayu. Jumlahnya hanya sedikit, biasanya tidak melebihi 1%.

Kandungan setiap komponen kayu biasanya diberikan dalam persen berat kayu kering tanur (oven). Dalam laboratorium kimia kayu akan dikaji kandungan ekstraktif, kandungan holoselulosa, kandungan selulosa dan kandungan lignin. Bahan-bahan yang diperoleh dari analisis pertama akan digunakan untuk penentuan-penentuan berikutnya.

2

PENENTUAN KANDUNGAN EKSTRAKTIF (TAPPI T 6 M - 59)

Sampel kayu harus dijadikan serbuk kayu terlebih dahulu dan kemudian dipisahkan dengan pengayak (saringan). Serbuk kayu, yang besarnya antara 0,1-0,40 mm (artinya melalui ayak dengan lubang kurang lebih 0,4 mm dan ditahan pada ayak dengan lubang 0,1 mm) digunakan untuk analisis-analisis berikut. Serbuk kayu harus kering udara dan disimpan dalam sebuah botol atau *vessel* yang bertutup rapat. Ini dimaksudkan untuk menghindari perubahan kelembapan serbuk kayu.

Sebelum dilakukan analisis kandungan komponen kimia, terlebih dahulu sampel yang berupa partikel dimasukkan ke dalam kantong plastik klip dan diletakkan di ruang yang konstan. Selanjutnya, dilakukan pengukuran faktor kelembapan (*moisture factor/MF*) dengan menggunakan standar **TAPPI 264 om-88** sebagai berikut.

1. Botol timbang yang kering dan bersih dioven selama 30 menit kemudian dimasukkan ke dalam desikator selama ± 15 menit.
2. Botol ditimbang kemudian masukkan serbuk sebanyak ± 2 gram ditimbang.
3. Keringkan dalam oven dengan suhu ($105 \pm 3^\circ\text{C}$) selama ± 4 jam.
4. Kemudian timbang sampel, setelah itu dimasukkan lagi ke dalam oven selama 2 jam.

5. Pengovenan dan penimbangan dilakukan sampai berat konstan.
6. Faktor kelembapan (*moisture faactor*/MF) dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$Mf = \frac{B}{A}$$

Di mana:

MF = Faktor kelembapan (*moisture factor*)

A = Berat awal sampel (gram)

B = Berat kering tanur (gram)

Ekstraktif dipisahkan dari serbuk kayu dengan pengekstrakan dengan alat Soxhlet atau Twisselman. Pada alat Soxhlet harus diperhatikan bahwa larutan ekstrak pada bagian sebelah atas dialirkan ke dalam labu didih bundar secara teratur. Pengekstrakan dengan alat Twisselman lebih mudah. Tetapi harus diperhatikan bahwa serbuk kayu dimasukkan dalam sebuah timbel (kertas sipon) yang menguras larutan ekstrak. Menurut TAPPI larutan pengekstraksi ialah campuran etanol dan benzena. Tetapi benzena dapat menimbulkan kanker, karena itu sekarang dianjurkan menggunakan toluena atau sikloheksana sebagai pengganti benzena. Pengekstrakan dengan campuran bahan pelarut bersifat nonpolar dan polar memberikan kandungan yang lebih tinggi. Etanol saja akan melarutkan senyawa-senyawa bersifat polar. Sebaliknya pengekstrakan dengan toluena akan mengekstrak senyawa-senyawa yang nonpolar. Campuran kedua bahan pelarut memberikan hasil yang lebih besar dibandingkan

dengan jumlah kedua pengestrakan yang hanya dilakukan dengan hanya satu bahan pelarut saja.

Larutan campuran etanol dan toluena mengandung bahan-bahan ekstraktif. Jika bahan pelarut disulingkan, ekstraktif akan didapati sebagai ekstrak (endapan). Berat ekstraktif yang dipisahkan dihitung berdasarkan pada berat serbuk kayu kering tanur.

Serbuk kayu yang telah terbebas dari bahan ekstraktif akan digunakan untuk penentuan kandungan holoselulosa dan lignin. Serbuk kayu yang telah diekstrak hanya boleh dikeringkan hingga 40°C. TAPPI menganjurkan mengekstrak serbuk kayu ini dengan air panas selama 3 jam. Petunjuk ini dikembangkan untuk kayu konifera (daun jarum), tetapi kurang baik untuk kayu daun lebar. Untuk menghilangkan sisa-sisa bahan pelarut, serbuk yang telah diekstrak diperlakukan berturut-turut dengan etanol dan air panas (suhu hingga 40°C) sewaktu menapis (menyaring). Serbuk kayu kemudian dikeringkan di udara atau dalam pengering vakum pada suhu 40°C hingga kadar air kayu sekitar 15%.

TAPPI T 6 m-59 memberikan petunjuk melakukan analisis kandungan ekstraktif. Penentuan tersebut hanya memerlukan 2 gram serbuk kayu yang kelembapannya diketahui. Karena dalam analisis-analisis berikut diperlukan serbuk yang telah diekstrak, maka penentuan dilakukan dengan 10 gram atau lebih (menurut besarnya cangkir saring untuk serbuk kayu).

Peralatan yang diperlukan

1. Alat Soxhlet, dengan volume kurang lebih 100 ml atau lebih.
2. Labu didih dengan dasar bundar, volume 250 ml.

3. “*Filter thimbles*” atau cangkir tras yang cocok untuk Soxhlet.
4. “*Boiling stones*” atau batu didih, sebaiknya dari teflon, untuk menghindari *boiling delay*.
5. Serbuk kayu, kering udara dan diayak. Serbuk $>0,1$ mm dan $<0,4$ mm.
6. Alat pemanas untuk Soxhlet. Alat Soxhlet boleh digantikan dengan alat Twisselman.
7. Timbangan analisis
8. Eksikator dengan kalsium klorida atau silika gel yang baru dikeringkan, jadi masih berwarna biru.
9. Oven

Bahan Kimia

Pelarut: etanol, toluena, atau sikloheksana. Diperlukan 100 ml toluena atau sikloheksana dan 200 ml etanol untuk tiap penentuan.

3.

PROSEDUR PENENTUAN EKSTRAKTIF

3.1. Pengekstrakan (Ekstraksi)

Kelembapan serbuk ditentukan dan kemudian serbuk kayu sebanyak 10 g (dihitung sebagai kering tanur) dimasukkan dalam cawan turas (kertas sapon). Di atas serbuk kayu ditempatkan segumpal kapas (kapas dari kotak P3K boleh juga digunakan) supaya serbuk kayu tidak terserak sewaktu pengekstrakan. Cawan turas yang berisi serbuk kayu dimasukkan dalam alat Soxhlet. Sebelumnya labu didih dasar bundar (*round flask*) dikeringkan dalam oven pengering, didinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Sebanyak 200 ml pelarut (campuran dari toluena atau sikloheksana dengan etanol dalam perbandingan volume 2:1) dimasukkan dalam *round flask*.

Dua buah batu didih (*boiling stones*) ditimbang dan dimasukkan dalam labu didih bundar. Kemudian alat pemanas disetel dan diatur sehingga larutan mendidih dengan baik. Harus diperhatikan bahwa alat Soxhlet diisi dan dikosongkan secara teratur. Pengekstrakan dilakukan sekurang-kurangnya 4 jam. Ekstrak dari Soxhlet atau Twisselman seharusnya tidak berwarna lagi sesudah 4 jam. Jika larutan belum cerah, pengekstrakan harus diteruskan hingga larutan tidak berwarna.

Tunggu sampai kesemuanya dingin kembali. Kalau bisa batu didih diambil dari labu didih bundar. Volume larutan ekstrak ditentukan dengan menggunakan gelas ukur. Setengah dari isi (volume) larutan ekstrak dikembalikan dalam labu didih bundar. Kemudian pelarut disulingkan dalam penyulingan putar

(*rotary evaporator*) dengan menggunakan vakum. Harus diperhatikan jangan sampai ada larutan terbuang. Setelah pelarut dan air disulingkan, *round flask* dikeringkan dalam oven pengering pada suhu 105°C hingga beratnya konstan. Pertambahan berat *round flask* adalah kandungan ekstraktif. Jika batu didih tidak dikeluarkan sebelum penyulingan, beratnya batu didih harus dikurangkan dari pertambahan berat *round flask*.

$$\text{Kandungan ekstraktif} = \frac{\text{Pertambahan berat labu bundar} \times 2}{\text{berat serbuk kayu (kering tanur)}} \times 100\%$$

Bahan ekstraktif ini tidak boleh digunakan lagi untuk penyelidikan seterusnya karena telah dikeringkan dalam pengering oven dan berubah susunan kimianya.

3.2. Analisis Bahan Ekstraktif

Jika hendak menyelidiki bahan ekstraktif, bahan tersebut tidak boleh dikeringkan dalam oven pengeringan pada suhu 105°C. Sebaiknya larutan etanol/toluena yang belum diperlakukan, disulingkan dengan penyuling putar atau dengan alat penyuling dengan menggunakan vakum pada suhu maksimum 60°C. Larutan ekstraktif disulingkan hingga tidak ada bahan pelarut lagi. Berat labu didih yang digunakan ditentukan sebelumnya. Labu didih bundar dengan isinya dikeringkan dalam eksikator dengan menggunakan vakum. Setelah kering, ditimbang. Dalam penyelidikan ekstraktif kayu jati, bahan ekstrak ini mengandung bahan ekstraktif kayu jati.

Diketahui bahwa kayu jati mempunyai keawetan alami yang tinggi. Ketahanan ini disebabkan adanya berbagai 'bahan pengawet alami' dalam ekstraktif jati. Dalam percobaan berikut beberapa senyawa ini akan ditentukan dengan menggunakan

kromatografi lapisan tipis. Pemisahan dilakukan dengan lapisan silika gel.

Jika senyawa hendak dipisahkan sebaiknya pengestrakan dilakukan berperingkat. Mula-mula pengestrakan dilakukan dengan larutan yang tidak polar dan kemudian dengan larutan yang lebih polar. Urutan-urutan yang banyak digunakan ialah heksana atau petroleter, dietileter, campuran aseton/air (9:1), etanol/air (8:2), dan terakhir air panas. Setiap larutan disulingkan dan ekstraknya diperlukan untuk penyelidikan-penyelidikan. Jika diduga bahwa masih ada bahan ekstraktif yang belum diekstrak, serbuk kayu boleh diperlakukan dengan larutan 1% NaOH.

Pada percobaan ini bahan ekstraktif telah ada dalam campuran larutan toluena/etanol. Setelah bahan pelarut disulingkan, ekstraknya kemudian diekstraksi lagi berturut-turut dengan petroleter, dan kloroform. Cara pengestrakan ialah dengan memanaskan 50 ml petroleter dengan refluks selama 15 menit dalam *round flask*. Setelah agak dingin larutan petroleter dituangkan berhati-hati ke dalam *round flask* lain. Harus diperhatikan jangan ada bagian yang tidak larut turut dalam *round flask* dengan larutan petroleter. Pengestrakan dengan menggunakan refluks dilakukan seluruhnya 3x. Seluruh larutan petroleter disatukan dalam labu didih bundar yang telah diketahui beratnya. Petroleter disulingkan dengan penyuling putar. Ekstraknya dikeringkan dalam eksikator dan ditimbang. Ekstrak ini kemudian diekstrak lagi dengan 3x50 ml aseton dengan menggunakan refluks. Yang tidak larut, atau ekstrak dalam *round flask* ialah getah asli. Jika memungkinkan getah asli ini akan dibersihkan dengan menggunakan arang aktif. Getah ini akan dibandingkan dengan getah asli dari kayu getah. Sebaiknya

dibuat spektrum infra merah dan dibandingkan dengan spektrum infra merah getah asli dari kayu getah.

Bagian yang larut dalam aseton disulingkan. Ekstraknya dilarutkan dalam etanol hingga kepekatan 0,5%. Ini akan digunakan nanti untuk analisis kromatografi lapisan tipis (TLC: *thin layer chromatography*).

Ekstrak pertama dari pengestrakan dengan petroleter diperlakukan lagi 3x dengan 50 ml kloroform. Larutan juga dipisahkan. Ini tidak akan mudah, karena ada saja bagian yang lebih ringan dari kloroform, sehingga mengapung. Karena itu, jika tidak mungkin pemisahan, dilakukan penurasan. Bagian-bagian yang larut dalam kloroform disatukan, dan disulingkan hingga kering. Kemudian ditimbang. Ekstraknya dilarutkan dalam etanol hingga kepekatan (konsentrasi) 0,5%. Ini akan digunakan untuk kromatografi lapisan tipis.

Ekstrak dari perlakuan dengan kloroform mengandung senyawa-senyawa polar. Dalam kayu jati susunan kimia senyawa-senyawa ini belum banyak diselidiki. Karena itu dalam percobaan ini ekstraknya tidak akan dianalisis lebih lanjut.

Pengestrakan dengan petroleter dan kloroform memisahkan senyawa-senyawa yang menyebabkan keawetan kayu jati. Senyawa-senyawa ini akan dipisahkan dengan KLT (Kromatografi Lapisan Tipis). Bahan senyawa perbandingan dalam analisis ini ialah: tektokuinon, lapakhol, deoksilapakhol, tektol, dehidrotektol. Senyawa yang banyak terdapat dalam kayu jati ialah tektokuinon dan sering juga lapakhol. Senyawa lainnya terdapat dalam jumlah sedikit, dan sering tidak bisa ditentukan dengan kromatografi lapisan tipis saja.

3.2.1. Kromatografi Lapisan Tipis (KLT)

Metode ini adalah metode relatif. Karena itu selalu diperlukan senyawa tulen (autentik) atau murni sebagai perbandingan. Hanya dengan perbandingan kita boleh mengambil keputusan atau memastikan bahwa dua senyawa sama. Senyawa tulen dan senyawa yang hendak dianalisis harus menunjukkan ciri-ciri yang sama dalam sekurang-kurangnya tiga fase mobil. Ciri-ciri ini ialah nilai R_f , warna dalam UV, dan warna setelah diberikan bahan pendeteksi. Jika digunakan lapisan yang lebih tebal, umpamanya setebal 1-2 mm, maka metode KLT bisa digunakan untuk memisahkan senyawa yang dikehendaki. Larutan diberikan dalam jumlah yang lebih banyak. Setelah tercapai pemisahan senyawa yang dikehendaki diambil dari lapisan gelas. Silika gel ini diekstraksi dengan bahan pelarut, umpamanya dengan etanol. Setelah etanol disulingkan ekstraknya merupakan senyawa murni. Biasanya dalam larutan ini didapati sedikit silika gel. Untuk memisahkan silika gel, ekstrak dilarutkan lagi dalam bahan pelarut organik yang tidak polar, misalnya petroleter atau etileter. Larutan disaring dengan kertas saring kuantitatif. Ekstraknya dijadikan hablur. Hablur biasanya merupakan senyawa murni, dan titik leburnya bisa ditentukan dan dibandingkan dengan sifat-sifat senyawa murni. Metode sublimasi sering digunakan untuk memperoleh senyawa murni. Proses sublimasi sebaiknya menggunakan vakum tinggi dan suhu di bawah titik lebur senyawa.

Dalam metode kromatografi lapisan tipis (KLT atau TLC) larutan bahan ekstraktif diberikan pada lapisan tipis. Sebaiknya diberikan hanya beberapa mikro liter saja, karena bintik harusnya sekecil mungkin. Umumnya garis tengah bintik-bintik hanya beberapa mm saja. Sedapat mungkin semua bintik-bintik harus mempunyai diameter yang sama. Dengan

memberikan volume yang berbeda-beda, bisa ditentukan jumlah yang paling tepat. Untuk memperoleh garis tengah bintik-bintik yang kecil bahan pelarut harus diuapkan dalam waktu singkat dengan menggunakan alat pengering rambut.

Jarak antara dua bintik sebesar 15 mm. Dari tepi hendaknya juga 15 mm. Senyawa bandingan juga diberikan pada lapisan tipis. Setelah kering bisa dimasukkan dalam *vessel* untuk KLT. Dalam percobaan ini digunakan toluena. Berikan 100 ml toluena dalam *vessel*. Dinding *vessel* dilapisi dengan kertas saring putih, untuk memperoleh keadaan jenuh uap dalam *vessel*. Waktu hingga diperoleh keadaan jenuh uap ialah setengah jam.

Plat dimasukkan dalam *vessel* dan ditutup kembali. Setelah larutan fase mobil, dalam hal ini toluena, telah naik 10 hingga 15 cm, lapisan tipis tersebut dikeluarkan, dan tinggi fase mobil dicatat. Sebaiknya diberikan tanda jika pelat dikeluarkan dari *vessel*. Setelah itu dikeringkan, dan diamati dalam UV. Bintik-bintik yang dipisahkan diberi tanda dengan pensil. Nilai R_f setiap bintik ditentukan dan dicatat. Untuk membedakan senyawa-senyawa, lapisan tipis disembur dengan campuran asam sulfat dalam etanol atau metanol (kandungan H_2SO_4 kurang lebih 3%). Penyemprotan harus dilakukan dalam ruang asam atau harus diperhatikan jangan menghirup uap yang mengandung asam sulfat ini. Setelah kering dipanaskan dalam oven pada suhu $120^\circ C$ selama lima menit atau lebih lama hingga warna kelihatan dengan nyata. Dalam rujukan sangat banyak metode-metode untuk mendeteksi berbagai senyawa. Hampir untuk tiap kelompok senyawa dikenal berbagai metode deteksi. Ditinjau dari segi ini kromatografi lapisan tipis sangat baik digunakan untuk berbagai jenis senyawa.

Jika diinginkan melihat senyawa-senyawa lain yang mempunyai nilai R_f rendah, bisa dilakukan pemisahan dengan

kaidah dua dimensi. Untuk ini diperlukan sebuah pelat dengan lapisan tipis berukuran 20x20 cm. Bahan analisis diberikan pada satu sudut, sebaiknya pada sudut sebelah kiri. Pada sebelah kanan dan sebelah atas diberikan senyawa-senyawa perbandingan. Setelah kering dimasukkan dalam *vessel* pemisahan. Lapisan tipis dikeluarkan setelah fase mobil berjalan 10-12 cm, dan tidak boleh sampai pada senyawa perbandingan pada sebelah atas. Dikeringkan di dalam ruangan tanpa menggunakan oven. Lapisan tipis kemudian dimasukkan dalam *vessel* kedua, yang diisi dengan fase mobil yang mempunyai polaritas lebih tinggi. Arah pemisahan 90° dengan pemisahan pertama. Pemisahan kedua maksudnya memisahkan senyawa-senyawa yang mempunyai nilai R_f rendah. Fase mobil kedua juga tidak boleh sampai pada senyawa perbandingan. Setelah pemisahan selesai lapisan tipis dikeringkan, diamati dalam UV, disemprot dengan bahan deteksi, dipanaskan dalam oven, dan dicatat.

Prinsip KLT juga dapat digunakan untuk penentuan kuantitatif. Metode yang paling sederhana, yang banyak digunakan untuk analisis orientasi, menggunakan hubungan antara luas bintik-bintik dan jumlah senyawa yang diberikan. Antara logaritma luas bintik-bintik dan berat senyawa didapati korelasi biasa. Jika diberikan senyawa perbandingan murni dalam jumlah berbeda-beda maka akan diperoleh luas bintik-bintik yang berbeda. Volume senyawa perbandingan yang diberikan harus selalu sama, supaya diameter pada permulaan selalu sama. Ini sangat penting. Juga susunan bahan pelarut harus selalu sama. Penentuan luas bintik-bintik tidak boleh dilakukan dengan planimeter. Metode yang paling sederhana ialah membuat fotostat. Bintik-bintik kemudian digunting dan ditimbang dengan neraca analisis. Berat kertas fotostat untuk tiap cm^2 ditentukan. Berat bintik-bintik dibagi dengan berat untuk 1 cm^2 kertas

fotostat memberikan luas bintik-bintik tersebut. Boleh juga digunakan berat kertas fotostat dengan langsung untuk membuat kurva kalibrasi (*calibration curve*).

Berdasarkan hasil-hasil di atas dibuatlah sebuah kurva kalibrasi. Kurva ini hanya berlaku untuk setiap pelat atau lapisan tipis. Tiap pelat harus menggunakan kurva kalibrasi yang baru. Jika analisis dilakukan dengan cermat dan hati-hati hasil analisis boleh mencapai ketelitian 5-10%. Metode ini sangat baik, murah, dan sederhana. Tetapi harus dilakukan dengan teliti dan cermat.

Pada peralatan TLC yang canggih, pemberian senyawa dilakukan secara otomatis. Deteksi dilakukan dengan pencelupan. Pemanasan dilakukan dalam oven. Penentuan kuantitas dilakukan dengan densitometer. Densitometer bisa berdasarkan pantulan atau cahaya terusan. Ketelitian metode KLT yang canggih menyerupai metode modern lainnya.

Dibandingkan dengan metode-metode lain, KLT lebih murah karena hanya menggunakan sedikit bahan pelarut. Lapisan tipis yang sekarang bisa diperoleh dalam perdagangan mempunyai sifat-sifat yang baik dan boleh digunakan. Ada berbagai jenis adsorben atau bahan pemisah. Pilihan bahan pemisah (adsorben) bisa disesuaikan dengan senyawa yang hendak dianalisis. Rujukan untuk KLT sangat banyak, demikian juga buku-buku yang baik dan sesuai. Perusahaan-perusahaan penjual atau pembuat pelat KLT bisa ditanyakan tentang metode pemisahan yang terbaik. Biaya peralatan canggih KLT hampir sama dengan peralatan analisis modern lainnya. Karena itu jika hendak memilih peralatan untuk analisis berbagai senyawa, haruslah dipertimbangkan membeli alat KLT yang modern dan canggih.

Dalam bagian akhir tulisan ini dijelaskan petunjuk untuk melakukan analisis bahan ekstraktif dari jati. Dalam percobaan laboratorium ada beberapa metode penentuan yang lainnya.

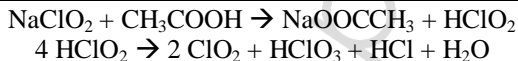
deepublish / publisher

4.

PENENTUAN KANDUNGAN HOLOSELULOSA

4.1. Dasar-Dasar Reaksi

Serbuk kayu yang bebas dari ekstraktif dioksidasi dengan ClO_2 . Pengoksida ini dibentuk berdasarkan reaksi berikut:



Lignin dioksidasi dan menjadi larut. Holoselulosa diperoleh sebagai sisa (ekstrak). Karena banyaknya ClO_2 yang dibentuk sedikit dan reaksi oksidasi lambat, pemberian natrium klorit dilakukan bertahap, yaitu setiap jam. Reaksi dengan natrium klorit ini sering dinamakan reaksi menurut WISE. Biasanya oksidasi dengan natrium klorit dilakukan pada suhu 75°C semasa tiga jam untuk kayu daun lebar dan 4 jam untuk kayu konifera (daun jarum). Sisanya mungkin masih mengandung lignin. Jika hendak diketahui kandungan holoselulosa dengan teliti, kandungan ligninnya ditentukan.

4.2. Metode Penentuan

Serbuk kayu yang telah diekstrak dengan campuran toluena/etanol dikeluarkan dari cawan turas (*filter thimble*), dicampur dengan etanol dan dituras dengan vakum. Serbuk kayu dicuci 2x lagi dengan larutan etanol dan dituras. Setelah itu dicuci lagi dengan air panas (suhu 40°C) dan dituras. Ini diulangi

sampai 3x. Serbuk kayu diserakkan di atas dan dikeringkan. Untuk mempercepat pengeringan sebaiknya serbuk tersebut dilakukan dalam pengering vakum hingga serbuk kayu kering udara. Serbuk kayu yang telah kering udara dimasukkan dalam sebuah botol dengan tutup rapat. Kelembapannya ditentukan. Sebanyak 5 gram serbuk kayu (kering tanur) dimasukkan dalam sebuah erlenmeyer volume 200 ml dengan leher lebar. 1,5 gram NaClO₂ dilarutkan dalam 160 ml air suling dan diberikan 10 tetes asam asetat. Larutan ini diberikan pada serbuk kayu. Erlenmeyer ditutup dengan gelas erlenmeyer kecil yang terbalik. Oksidasi dilakukan pada suhu 75°C. Sese kali gelas erlenmeyer dikocok. Setelah satu jam diberikan lagi 1,5 gram NaClO₂ dan 10 tetes asam asetat. Jumlah natrium klorit seluruhnya ialah 3x1,5 g. Sesudah tiga jam hasil oksidasi didinginkan dengan menempatkan gelas erlenmeyer dalam air es dan memberikan es. Setelah dingin dituras melalui cawan turas (saring) dari gelas (2 G 2) yang telah diketahui beratnya. Sisa (endapan) dicuci mula-mula dengan air es, hingga turasan netral, dan kemudian dengan aseton. Cawan turas bersama-sama dengan holoselulosa dikeringkan dalam pengering vakum pada suhu 40°C hingga beratnya konstan.

$$\text{Kandungan holoselulosa} = \frac{\text{Berat holoselulosa}}{\text{Berat serbuk kayu}} \times 100\%$$

(Berat serbuk kayu yang telah diekstrak)

Biasanya holoselulosa yang telah dipisahkan masih mengandung sedikit lignin. Jika hendak mengetahui kandungan holoselulosa secara teliti, kandungan lignin dalam holoselulosa ditentukan. Kandungan ini dikurangi dari kandungan yang telah disebutkan di atas.

4.3. Peralatan yang Diperlukan

1. Timbangan analisis
2. Labu erlenmeyer, 200 ml dengan leher luas
3. Labu erlenmeyer, 50 ml, dengan leher sempit
4. Rendaman air (*waterbath*)
5. Pipet (*droptube*) untuk meneteskan larutan
6. Labu penuras (*filtering flask*), volume sedikit-dikitnya 1 l
7. Pompa vakum
8. Cawan turas dari gelas (*filter crucibles 2 G 2*)
9. Pengereng (oven) vakum
10. Cawan timbang (*weighing bottles*) untuk menimbang *filter crucibles*
11. Batang gelas untuk mengocok
12. Gelas ukur, volume 250 ml

4.4. Bahan Kimia

1. Asam asetat (*acetic acid*)
2. Natrium klorit (NaClO_2) p.a.
3. Aseton
4. Air Suling

4.5. Metode Penentuan

Sebanyak 2 gram holoselulosa (dihitung sebagai kering tanur) dimasukkan ke dalam sebuah Becker gelas volume 500 ml. Ke dalamnya diberi 200 ml asam sulfat encer (1,3%). Hidrolisis dilakukan dalam rendaman air (*waterbath*) yang berisi air mendidih. Air yang menguap selalu diganti dengan air suling, sehingga volume asam sulfat tetap sama. Setelah dua jam selulosa atau sisa dituras melalui cawan turas dari gelas (2 G 2) yang beratnya diketahui. Selulosa dibasuh dengan air suling hingga turasan netral (pakai kertas lakmus). Kemudian dicuci

dengan etanol dan sisanya dikeringkan dalam oven pengering (105°C) hingga beratnya konstan. Kandungan selulosa menurut Cross-Bevan dihitung berdasarkan serbuk kayu tanpa ekstraktif dan kering tanur.

4.6. Peralatan

1. Holoselulosa dari penentuan holoselulosa yang telah dilakukan. Jika tidak mencukupi, akan disediakan oleh kepala lab. kimia kayu
2. Gelas beker, volume 500 ml
3. Rendaman air (*waterbath*)
4. Cawan turas dari gelas (*filter crucibles 2 G 2*)
5. Botol timbang (*weighing bottles*) untuk menimbang cawan turas
6. Botol cuci (*wash bottle*)
7. Labu turas/saring (*filtering flask* volume 1 l)
8. Oven

4.7. Bahan Kimia

1. Asam sulfat (1,3%)
2. Etanol
3. Air suling
4. Kertas lakmus

5.

PENENTUAN KANDUNGAN SELULOSA MENURUT CROSS-BEVAN

Metode ini menjadi standar menurut TAPPI – T 9 m – 54. Holoselulosa yang dipisahkan masih mengandung hemiselulosa. Untuk menentukan kandungan selulosa saja, holoselulosa dihidrolisis dengan asam encer. Selain hemiselulosa bagian selulosa yang amorf juga akan dihidrolisis. Sisanya dianggap selulosa Cross-Bevan.

6.

PENENTUAN KANDUNGAN LIGNIN (LIGNIN KLASON)

6.1. Dasar dan Metode Penentuan

Metode yang menggunakan asam sulfat untuk menghidrolisis polisakarida sehingga larut dan lignin tinggal sebagai sisa telah jadi metode standard di banyak negara. TAPPI Standard T 13 m-54 menggunakan dua macam konsentrasi asam sulfat. Yang pertama ialah asam sulfat pekat (72%) dan yang kedua asam sulfat encer (3%). Perlakuan dengan asam sulfat pekat menyebabkan lignin berkondensasi, sehingga tidak larut dalam asam sulfat pekat. Hidrolisis dengan asam sulfat encer kemudian menghidrolisis polisakarida sehingga larut dalam air. Karena senyawa organik lainnya seperti fenol-fenol dan protein dalam kayu bisa berkondensasi, kesemuanya harus diekstrak terlebih dahulu sebelum penentuan kandungan lignin. Dalam penentuan yang teliti kandungan abu lignin sebaiknya ditentukan. Jumlahnya dikurangi dari hasil penentuan lignin.

6.2. Metode Penentuan

Sebanyak 1 gram serbuk kayu (dihitung berdasarkan kering tanur) yang telah diekstrak dan kering udara dimasukkan dalam Becker gelas kecil (volume 25 ml atau 50 ml). 25 ml Asam sulfat pekat (72%) dingin (dari kotak es) diberikan sedikit demi sedikit pada serbuk kayu sambil dikocok dengan batang gelas pendek. Waktu pemberian kurang lebih satu menit.

Kesemuanya dibiarkan 2 jam dalam rendaman air es supaya suhunya tidak melebihi 20°C. Sesekali campuran asam sulfat dan serbuk kayu dikocok dengan batang gelas pendek. Setelah dua jam isi gelas beker dimasukkan dalam sebuah labu erlenmeyer (volume 1 l) dengan menggunakan seluruhnya 560 ml air suling. Labu erlenmeyer dipanaskan dengan refluks, hingga mendidih sempurna selama empat jam. Hidrolisis dengan asam sulfat encer ini sangat penting, karena semua polisakarida harus dihidrolisis. Kemudian didinginkan, dibiarkan mengendap dan dituras melalui cawan turas gelas (2 G 3) yang telah diketahui beratnya dengan menggunakan vakum dan labu turasan. Sering kali bagian sisa tidak mudah dituras karena tidak merupakan endapan yang baik. Pencucian dilakukan dengan seluruhnya 500 ml air panas hingga turasan netral. Kemudian cawan turas dikeringkan dalam pengering oven sampai beratnya konstan.

$$\text{Kandungan lignin} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat serbuk kayu (BKT)}} \times 100 \%$$

BKT= berat kering tanur

Untuk penentuan yang teliti kandungan abu lignin harus ditentukan dan jumlahnya dikurangi dari kandungan lignin.

Jika hendak dilakukan analisis dari monomer-monomer turasan dari penentuan lignin boleh digunakan. Seluruh larutan turasan dikumpulkan dan ditentukan volumenya dengan teliti. Dalam larutan ini didapati asam sulfat. Untuk berbagai analisis ion-ion sulfat harus disampingkan sebelum digunakan. Menghilangkan ion-ion sulfat sebaiknya dengan menggunakan resin penukaran ion yang bersifat basa kuat dalam bentuk hidroksida. Ion-ion sulfat akan diikat oleh resin penukar ion. Larutan akan bebas dari ion-ion ini, dan setelah diuapkan dapat

digunakan untuk analisis karbohidrat. Metode analisis bisa menggunakan kromatografi lapisan tipis, kromatografi larutan tekanan tinggi (*high pressure liquid chromatography*), kromatografi kertas (*paper chromatography*), dan setelah dijadikan turunan yang bisa menguap dengan kromatografi gas (*gas chromatography*). Ada sebuah metode yang memungkinkan analisis larutan setelah penentuan lignin menurut TAPPI. Ini adalah kromatografi penukaran ion dengan menggunakan larutan “penimbang borat”. Karbohidrat ditentukan dalam eluat dengan berbagai bahan deteksi. Metode ini sangat baik untuk segala analisis di mana diperlukan hidrolisis dengan asam sulfat atau asam lainnya.

6.3. Peralatan

1. Serbuk kayu tanpa ekstraktif (dari penentuan kandungan ekstraktif) atau disediakan oleh ketua lab kimia kayu
2. Gelas beker vol. 25 ml atau 50 ml
3. Labu erlenmeyer atau labu bundar yang cocok pada kondensor refluks volume 1 l
4. Kondensor refluks yang cocok pada labu erlenmeyer atau labu didih bundar
5. Cawan turas dari gelas (2 G 3). Jangan menggunakan cawan turas dengan porositas lebih rendah, umpamanya G 2, karena nanti tidak semua lignin dituras dari larutan hidrolisis
6. Botol cuci
7. Labu turas (saring), volume 1 l
8. Oven

6.4. Bahan Kimia

1. Asam sulfat
2. Air suling dan es
3. Kertas lakmus

7.

PERTANYAAN-PERTANYAAN DAN LAPORAN

Laporan berisi tentang penentuan-penentuan yang telah dilakukan. Yang harus diperhatikan dan dibahas adalah terutama dasar dari metode analisis. Hasil-hasil yang diperoleh dibandingkan dengan data dari rujukan. Jika didapat perbedaan yang agak besar berikanlah sebab dari perbedaan-perbedaan tersebut.

Kadar bahan ekstraktif adalah sekitar beberapa persen hingga 30%. Walaupun kadarnya tidak terlalu tinggi, tetapi ekstraktif memiliki pengaruhnya yang besar pada sifat-sifat kayu. Ekstraktif memengaruhi warna, bau, rasa, gangguan pada kesehatan karyawan, keawetan, pH dan pengeleman, pengecatan, perlakuan terhadap semen, serta kebaikan untuk dibuat pulp.

Bahan ekstraktif dapat dibedakan berdasarkan daya larutnya dalam bahan pelarut organik yang netral. Jika serbuk kayu diekstraksi berturut-turut dengan benzena, eter, aseton dan aseton/air (9:1), maka senyawa-senyawa berikut akan dilarutkan.

Dalam benzena: hidrokarbon, senyawa karbosiklis dan heterosiklis yang tidak terikat pada glukosa, umpamanya terpenoida, steroid, khinona, kumarin, lemak serta asam lemak, artinya senyawa-senyawa lipofil. Sering golongan senyawa kimia demikian mempengaruhi pembasahan kayu dengan air, keawetan, gangguan pada kesehatan, umpamanya alergi terhadap

kayu-kayu tertentu, mengerasnya lak atau cat serta kebaikan untuk dibuat pulp.

Dalam eter: senyawa-senyawa yang lebih polar dari golongan terdahulu, meliputi fenol biasa dan mempunyai gugusan OH dan atau COOH.

Dalam aseton: fenol yang mempunyai OH banyak atau senyawa glukosida.

Dalam campuran aseton/air (9:1): bahan ekstraktif primer, karbohidrat, asam amino dan protein dan glukosida yang tidak larut dalam aseton murni.

Dalam dinding sel sering terdapat bahan ekstraktif yang tidak larut dalam bahan pelarut organik, tetapi dapat dilarutkan dalam basa encer, umpamanya 0,1 N KOH atau NaOH. Di samping itu dalam kayu terdapat bahan anorganik sebanyak 0,1–4%.

Di dalam dinding sel terdapat gugusan karboksilat yang diesterkan dengan etanol artinya dalam bentuk ester asam asetat. Tetapi ada juga yang bebas. Gugusan karboksilat bebas yang demikian dan juga gugusan OH dalam bahan ekstraktif mempengaruhi pH larutan yang berhubungan dengan dinding sel tersebut. Ini terjadi pada proses pengeleman kayu.

8.

CONTOH ANALISIS BAHAN EKSTRAKTIF DARI KAYU JATI

8.1. Pendahuluan

Dalam petunjuk laboratorium kayu telah diberikan metode-metode untuk mengekstrak kayu jati dan melakukan analisis kromatografi lapisan tipis. Analisis tersebut merupakan analisis orientasi. Jika hendak melakukan analisis yang lebih teliti, petunjuk berikut cocok untuk digunakan. Metode ini bisa dijadikan sebagai contoh untuk melakukan analisis bahan ekstraktif kayu lain.

8.2. Pengekstrakan (Ekstraksi) dan Pemisahan

8.2.1. Pengekstrakan dengan Petroleter

Sebanyak 10 g serbuk kayu (kering tanur) dalam keadaan kering udara diekstrak dalam alat Soxhlet atau Twisselman dengan petroleter hingga larutan pengekstrakan tidak berwarna lagi. Sekurang-kurangnya pengekstrakan dilakukan selama 8 jam. Larutan diuapkan dengan “*rotary evaporator*” atau alat penguapan vakum secara kuantitatif. Endapannya (ekstrak) dikeringkan dalam eksikator dengan vakum dan ditimbang. Kandungan bahan terekstrak yang larut dalam petroleter ditentukan. Seterusnya sisa (ekstrak) bahan terekstraktif yang larut dalam petroleter diekstrak dengan 125 ml aseton dengan menggunakan refluks. Pengekstrakan dilakukan seluruhnya tiga kali. Seluruh larutan aseton kemudian diuapkan dengan vakum

dan ditimbang. Endapannya, atau bagian yang tidak larut dalam aseton, adalah getah asli atau *kautschuk*, dan akan diselidiki dengan IR dan NMR. Senyawa ini sama dengan getah asli dari kayu getah.

Bahan terekstrak yang larut dalam aseton akan dipisahkan dalam bagian-bagian yang larut dalam 1 M natrium karbonat akuatik (senyawa-senyawa asam), 1 M natrium hidroksida akuatik (senyawa-senyawa fenol) dan bagian-bagian netral. Setelah diasamkan dengan asam klorida encer senyawa-senyawa diekstrak dengan eter. Larutan-larutan eter dikeringkan dan diuapkan.

Harus diperhatikan supaya hanya eter yang bebas dari peroksida digunakan. Metode yang bisa digunakan untuk merusak peroksida ialah memberikan natrium hidroksida dalam bentuk padat ke dalam eter, membiarkannya semalam dan kemudian menguapkan eter dengan menggunakan *water bath*. Dengan perlakuan demikian peroksida yang ada dalam eter akan rusak. Jika ada peroksida dalam eter, maka akan meletup sewaktu penguapan eter. Letupan peroksida berbahaya sekali. Lagi pula etil eter mempunyai titik nyala yang sangat rendah. Karena itu haruslah hati-hati jika menggunakan eter dan menghindarkan adanya lidah api atau bara api jika bekerja dengan etil eter. Eter yang telah tua, artinya telah lama disimpan dan kena cahaya matahari sering mengandung peroksida. Jika penggunaan eter dianggap terlalu berbahaya, ada kemungkinan lain, yaitu menggunakan diklorometana sebagai pengganti eter. Karena kerapatan (BJ) diklorometana lebih tinggi dari air, sehingga ia akan berada di bawah air. Sebaliknya lapisan eter ada di atas air.

8.2.1.1. Senyawa yang Larut dalam Natrium Karbonat

Larutan aseton diuapkan dengan penguapan vakum atau *rotary* evaporator. Bahan yang tidak larut ini dilarutkan dalam sedikit mungkin eter. Biasanya cukup jika kandungan bahan terekstrak dalam eter tidak melebihi 5 %. Eter diperlakukan dengan larutan natrium karbonat akuatik dalam corong pemisah. Senyawa-senyawa asam akan bereaksi dengan natrium karbonat, membentuk sabun dan menjadi larut dalam air. Berat jenis eter lebih kecil dari air. Karena itu air akan berada dalam lapisan bawah dan eter di lapisan atas. Batas antara kedua lapisan bisa dilihat. Tetapi sering terjadi batas tersebut tidak mudah dilihat, karena lapisan air sangat gelap. Lagi pula sering terjadi buih. Untuk menghindarkan buih boleh diberikan beberapa tetes metanol. Jika batas tidak mudah dilihat digunakanlah metode berikut.

Volume natrium karbonat dicatat. Kemudian dicampur dengan larutan eter dan dikocok. Corong pemisah kemudian dibiarkan beberapa waktu supaya terjadi pemisahan. Sekarang lapisan akuatik dipisahkan dan dicatat volumenya. Volume larutan natrium karbonat akuatik yang dipisahkan harus kurang lebih 10% lebih sedikit dari jumlah yang diberikan sebelumnya. Pemisahan dilakukan tiga kali berturut-turut.

Larutan natrium karbonat akuatik dikumpulkan. Untuk memisahkan asam-asam larutan ini harus diasamkan dengan asam klorida encer (2N). Harus diperhatikan bahwa dalam reaksi ini akan dibentuk karbon dioksida (gas). Jika tidak hati-hati gas ini akan menghembus eter dan air keluar dari beker gelas. Karena itu pemberian asam harus perlahan-lahan dan hati-hati, jangan sampai ada eter yang dihamburkan keluar. Sebaiknya beker gelas dengan larutan natrium karbonat ditempatkan dalam Beker gelas yang lebih besar. Jika ada eter yang keluar akan ditampung oleh

Beker gelas yang kedua. Kemudian diekstrak dalam corong pemisah (separator) dengan sedikit eter. Untuk memudahkan pengekstrakan diberikan garam biasa (natrium klorida) ke dalam air. Kemudian diekstrak dengan eter dalam corong pemisah. Ini dilakukan 3 kali berturut-turut. Larutan eter dikumpulkan dan diekstrak dengan air suling. Ini maksudnya mengekstrak garam yang larut dalam air yang ada dalam eter. Larutan eter dikeringkan dengan natrium sulfat kering, dituras dan diuapkan dengan alat penyuling putaran (*rotary evaporator*) atau dengan alat penguapan vakum yang lain.

Senyawa-senyawa yang berada dalam fraksi ini terdiri dari asam-asam karbonat dan *lapachol* (2-dimetilalil-3-hidroksi-1,4-naftakhinon). Adanya *lapachol* bisa dilihat dari warna merah dengan natrium karbonat. Fraksi ini dianalisis dengan TLC. Sebagian dilarutkan dalam etanol hingga kandungannya 0,2%. Fase mobil yang digunakan ialah campuran toluol dengan metanol. Banyaknya metanol akan ditentukan sendiri berdasarkan penyelidikan, yaitu dimulai dengan metanol 2,5%, 5% dan 10% serta 20%. Berdasarkan hasil analisis akan ditentukan kandungan metanol yang paling baik (sesuai). Dalam hal ini dicoba memperoleh Rf untuk *lapachol* antara 0,3 dan 0,6. TLC yang akan digunakan ialah silika gel. Selain *lapachol* dalam fraksi ini masih didapati banyak asam lain. Analisis asam-asam ini tidak mudah dilakukan dengan TLC. Sebaiknya menggunakan kromatografi gas (*gas chromatography*) setelah dijadikan ester metil. Sebaiknya larutan natrium karbonat diasamkan secepat mungkin untuk menghindarkan adanya hidrolisis atau reaksi lain antara natrium karbonat dan senyawa-senyawa dalam larutan ini. Baru setelah pengasaman dan pengekstrakan asam-asam bebas selesai, larutan eter barulah diperlakukan dengan natrium hidroksida akuatik.

8.2.1.2. Senyawa yang Larut dalam Natrium Hidroksida Akuatik

Pengekstrakan dilakukan 3 kali berturut-turut. Di sini juga sering tidak mudah membedakan dan memisahkan kedua lapisan dan corong pemisah. Metode yang telah dijelaskan bisa digunakan. Larutan natrium hidroksida akuatik diasamkan juga dengan asam klorida encer. Di sini tidak akan dibentuk karbon dioksida. Karena itu pengasaman boleh dilakukan dalam beker gelas biasa. Ke dalam air juga diberikan sedikit garam biasa untuk memudahkan pengekstrakan dengan eter. Pengekstrakan dengan eter dalam gelas pemisah dilakukan juga tiga kali berturut-turut supaya semua senyawa dilarutkan dalam eter dan dapat dipisahkan.

Seluruh larutan eter diekstrak lagi dua atau tiga kali dengan air suling, dikeringkan dengan natrium sulfat kering, dituras dan diuapkan dengan alat penguap putaran atau alat lain. Endapan (ekstrak) dikeringkan dalam eksikator dan ditimbang. Dalam fraksi ini akan didapati senyawa-senyawa fenol dan hidroksi antrakuinon. Dalam kayu jati dikenal beberapa hidroksi antrakuinon. Senyawa-senyawa demikian memberikan warna merah dengan alkali.

Sebagian dari ekstrak dilarutkan dalam etanol. Jika kelarutan untuk memperoleh kandungan 0,5% tidak cukup, maka boleh diberikan sedikit aseton atau diklorometana. TLC dilakukan dengan silika gel. Silika gel diperlakukan dahulu dengan larutan asam tartarat (*tartaric acid* 3,75%) dan kemudian dikeringkan dalam tanur pada suhu 105°C sampai kering. Setelah didinginkan dalam eksikator baru boleh digunakan sebagaimana biasa. Fase mobil terdiri dari campuran kloroform/metanol (99:1). Hidroksi antrakuinon memberikan warna merah dengan alkali, juga dengan amoniak.

8.2.1.3. Senyawa-Senyawa Netral

Ini adalah ekstrak yang larut dalam eter. Larutan eter dibasuh dengan air suling 2 sampai 3 kali. Kemudian larutan eter dikeringkan dengan natrium sulfat kering, dituras dan diuapkan. Dalam fraksi ini didapati β - metal antrakuinon atau tektokuinon. Selain itu mungkin didapati juga dehidrotektol. Senyawa ini berwarna biru dan biasanya didapati dalam jumlah sedikit, sehingga tidak mudah memisahkannya. Tetapi tektokuinon agak banyak dalam kayu jati, dan karena itu mudah memisahkannya.

Sebagian kecil dari ekstrak dilarutkan dalam etanol hingga kandungannya 0,5%. Dianalisis dengan TLC dengan menggunakan silika gel. Fase mobil boleh dicoba sendiri. Dimulai dengan toluena dan metanol (9:1). Lambat laun bagian metanol dinaikkan, sehingga tektokuinon menunjukkan R_f sekitar 0,4. Tektokuinon bisa dilihat sebagai bintik berwarna kuning muda dan dalam UV memberikan *fluorescence* yang kemerah-merahan (UV gelombang pendek), dan biru (gelombang UV panjang).

Pemisahan tektokuinon sebaiknya dengan TLC preparatif atau dengan kromatografi turus atau kolom (*column chromatography*) dengan silika gel. Jika ini tidak mungkin boleh juga mencoba dengan penghabluran dari larutan etanol. Baki dari pemisahan bagian yang netral dipanaskan dengan sedikit mungkin etanol secara refluks. Setelah larut semuanya dituras dalam keadaan panas dengan kertas turas. Kemudian turasan diuapkan sedikit dan akhirnya dibiarkan dalam beker gelas kecil dalam *frigidaire* selama semalam. Mungkin besoknya telah diperoleh hablur-hablur tektokuinon. Hablur-hablur ini dituras, dipisahkan dan dikeringkan dalam eksikator. Kemurniannya akan ditentukan dengan TLC, dan penentuan titik lebur (*melting point*). Titik lebur tektokuinon adalah 172 – 174°C.

Tektokuinon diperlukan untuk penentuan kandungan atau kadar tektokuinon dalam kayu jati. Rancangan ini bergantung pada kenyataan apakah tektokuinon bisa dipisahkan dalam keadaan murni. Tektokuinon murni diperlukan sebagai senyawa pembanding dan untuk menentukan kandungan senyawa ini dalam kayu.

Jika tidak diketahui jenis-jenis senyawa dalam bagian netral, biasanya dilakukan analisis berikut: bagian netral disabunkan dengan KOH (0,5N) dalam etanol. Gliserin akan disabunkan dari lemak. Asam karbonat dipisahkan (lihat di atas), kemudian diesterkan dengan diazometana dan dianalisis dengan kromatografi gas. Bagian yang tidak tersabunkan dianalisis dan dilakukan pemisahan antara senyawa-senyawa hidrokarbon dan senyawa berhidroksil, umpamanya sterin. Pemisahan bisa dilakukan dengan silika gel yang telah disesuaikan sehingga mempunyai gugusan aminopropil. Silika gel demikian dapat dibeli. Senyawa hidrokarbon dielusi (dilarutkan) dengan heksana, sedangkan senyawa berhidroksil dielusi dengan kloroform. Analisis kedua golongan ini biasanya dilakukan dengan kromatografi gas.

8.2.2. Pengekstrakan dengan Etil Eter

Setelah serbuk kayu diekstrak dengan petroleter, serbuk ini dikeringkan supaya bebas dari petroleter. Pengeringan cukup dilakukan diudara saja. Kemudian diekstrak dalam Soxhlet dengan etil eter yang bebas dari peroksida, selama 2 x 8 jam. Senyawa-senyawa yang terekstrak dengan eter juga meliputi sebagian dari senyawa yang didapati dalam ekstrak petroleter, karena mungkin tidak bisa dicapai oleh petroleter. Di samping itu senyawa-senyawanya seperti dalam ekstrak petroleter, tetapi mempunyai gugusan yang lebih polar, umpamanya asam

karbonat yang sebagian teroksidasi. Juga fenol-fenol dipisahkan dengan etil eter. Karena itu metode pemisahan ekstrak eter sama dengan ekstrak petroleter, tetapi tanpa perlakuan dengan aseton refluks. Fraksi masing-masing juga dianalisis dengan TLC.

Metode-metode yang telah digunakan dalam analisis bahan ekstrak petroleter bisa digunakan untuk bahan ekstrak eter.

8.2.3. Pengekstrakan dengan Aseton/Air (9:1) dan Etanol/Air (8:2)

Serbuk kayu sebelum pengekstrakan dengan aseton/air juga dikeringkan terlebih dahulu. Ekstrak aseton/air akan mengandung senyawa-senyawa karbohidrat bebas; polifenol bebas, umpamanya tanin terkondensasi, glikosida umpamanya tanin terhidrolisis serta flobafen. Senyawa-senyawa yang sama akan ditemui juga dalam ekstrak etanol/air (8:2). Tetapi di sini juga akan didapati senyawa menyerupai lignin. Asam amino akan didapati dalam ekstrak aseton/air (9:1), etanol/air (8:2) dan air.

Biasanya ekstrak-ekstrak diuapkan hingga kering. Setelah ditimbang dipisahkan dalam senyawa yang larut dalam air suling dan yang tidak. Pengekstrakan dengan air suling dilakukan dengan memanaskan 100 mg bahan ekstrak dalam 200 ml air suling pada suhu 45°C selama 2 h, sebaiknya sambil dikocok. Yang tidak larut diturunkan dengan gelas turas dan ditimbang. Yang larut akan dipisahkan dengan silika gel yang telah diberi perlakuan sehingga mempunyai gugusan oktildesil (C₁₈) dalam golongan gula bebas dan senyawa fenol. Gula dilarutkan dengan air suling, dan fenol dengan metanol. Jika diduga ada asam amino dalam larutan air, sebaiknya dilakukan deteksi asam amino dengan ninhidrin. Asam amino akan didapati bersama dengan gula dalam eluen air.

Gula dan asam amino boleh langsung dianalisis dengan TLC. Analisis asam amino sebaiknya dilakukan dengan TLC 2 dimensi dengan menggunakan silika gel. Fase mobil pertama ialah n-butanol/aseton/dietilamin/air (10:10:2:5) disusuli dengan isopropanol/asam format/air (40:2:10). Jika hendak dilakukan analisis kedua sebaiknya digunakan fase mobil berikut: n-butanol/aseton/dietilamin/air (10:10:2:5) diikuti oleh fenol/air (75:25). Deteksi dengan larutan ninhidrin (0,1% dalam etanol). Larutan ini harus disimpan dalam lemari pendingin dan tidak tahan lama. Gula dipisahkan dengan TLC memakai silika gel juga (lihat petunjuk dalam bab tentang ekstrak air).

Larutan fenol langsung dianalisis dengan TLC. TLC banyak dilakukan dengan silika gel dan menggunakan berbagai campuran umpamanya toluena/kloroform/aseton (40:25:35), etil asetat/metil etil keton asam format/air suling (5:3:1:1), etil asetat: asam format: air (85:10:15), butanol/asam asetat /air suling (4:1:5) sebagai fase mobil. Bintik-bintik diamati dalam UV dan dideteksi fenol, flavon, dan tanin. Warna dalam UV sering memberikan keterangan tentang kelas komponen. Selain itu warna dengan berbagai bahan deteksi membantu pengelasan senyawa. Larutan FeCl_3 , dalam etanol banyak digunakan untuk mendeteksi fenol. Sebagian boleh dihidrolisis dengan asam encer (2 M) atau basa encer (2M NaOH). Setelah larutan dingin fenol bebas diekstrak dengan etil eter atau etil asetat, dikeringkan sebelum dituras dan diuapkan. Jika hidrolisis dilakukan dengan NaOH sebelumnya perlu diasamkan dengan asam klorida encer dan kemudian diekstrak dengan eter atau etil asetat. Senyawa-senyawa ini kemudian dianalisis dengan TLC.

8.2.4. Pengekstrakan dengan Air

Pengekstrakan tidak usah dengan alat Soxhlet. Cukup diberikan 250 ml air suling dan dipanaskan pada suhu kurang lebih 60° C selama 1 jam. Setelah dituras diulangi pengekstrakan ini sekali lagi. Menurut pengalaman dalam ekstrak air panas ini didapati polisakarida yang larut dalam air panas. Polisakarida sebenarnya tidak digolongkan lagi dalam bahan terekstraktif. Jika ekstrak ini dihidrolisis dengan asam maka akan diperoleh monomer-monomer karbohidrat. Analisis boleh dilakukan dengan TLC. Salah satu fase mobil untuk analisis gula ialah campuran n-butanol/asam asetat/etil eter/air (9:6:3:1) atau asetonitril/air (85:15). Deteksi dengan semprotan 0,2% naftoresorsinol dalam 10% asam fosfat. Kemudian dipanaskan 10 menit pada 100° C. Warna ketos, pentos dan heksos masing-masing ialah merah muda, hijau dan biru. Boleh juga digunakan larutan naftoresorsinol dalam etanol yang diberikan beberapa tetes asam sulfat pekat.

8.2.5. Penyulingan dengan Uap Panas (*Steam*)

Penyulingan dengan *steam* dimaksudkan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bisa menguap. Metode ini banyak digunakan untuk memisahkan minyak penting (*essential oil*). Peralatan untuk metode ini diberikan secara singkat dalam uraian berikut. *Steam* (uap panas) dihasilkan oleh sebuah labu yang diisi air dan dipanaskan dengan gas atau listrik, hingga mendidih dengan baik. Untuk memperoleh tekanan uap yang tetap sama sebuah tabung gelas atau tembaga dimasukkan dalam labu pembentuk *steam* hingga masuk dalam air. Tabung gelas kedua ialah untuk uap. Uap ini dialirkan melalui tabung gelas berbentuk T. Pada satu saluran diberikan penjepit. Jika penjepit dibuka air kondensasi bisa dibuang. Adanya air kondensasi

dalam pipa uap akan mengganggu penyulingan *steam*, karena itu harus dibuang secara berkala.

Uap dialirkan ke dalam labu kedua yang juga berisi bahan lignoselulosa yang akan dianalisis. Labu ini juga dipanaskan hingga mendidih dan uap dialirkan ke dalamnya. Uap yang dihasilkan sebaiknya melalui sebuah trap dalam saluran penyulingan. Dengan metode demikian bahan lignoselulosa yang hendak disulingkan dengan uap panas tidak boleh sampai pada labu penerima bahan kondensat. Dengan menggunakan sebuah kondensor yang didinginkan dengan air mengalir, bahan-bahan yang menguap akan menjadi cairan kembali.

Karena minyak penting umumnya tidak larut dalam air, ia akan terapung di permukaan bahan kondensat, dan bisa dipisahkan. Kadang-kadang senyawa yang dipisahkan dengan penyulingan uap akan menghablur.

Jika serbuk kayu jati disulingkan dengan uap *steam*, akan diperoleh juga tektokuinon, dan mungkin juga deoksilapakhol dan lapakhol dalam bentuk hablur. Biasanya hasil penyulingan *steam* bisa dipisahkan dengan menggunakan corong pemisah. Jika hasilnya tidak begitu banyak, atau senyawa yang dihasilkan juga larut dalam air, maka haruslah dilakukan pengekstrakan dengan etil eter. Haruslah diingat supaya hanya menggunakan etil eter yang bebas dari peroksida. Larutan etil eter kemudian dikeringkan dengan natrium sulfat dan diuapkan hingga kering. Sebaiknya penguapan dilakukan pada suhu rendah sekali, supaya hasil penyulingan tidak menguap bersama dengan etil eter. Minyak esensial biasanya dianalisis dengan menggunakan kromatografi gas. Tetapi juga TLC bisa digunakan.

Jika hanya sedikit bahan lignoselulosa yang hendak dianalisis, alat untuk penentuan air dengan metode toluena bisa juga digunakan. Bahan lignoselulosa dimasukkan ke dalam labu

bundar dan ini diisi dengan air suling. Alat untuk menentukan kandungan kelembaban menurut metode toluena (bisa dilihat petunjuk lab fisika kayu) dihubungkan dengan labu didih bundar. Air dipanaskan hingga mendidih dengan baik. *Steam* yang dibentuk akan menyulingkan minyak esensial ke dalam tempat penentuan tersebut di atas. Karena minyak esensial tidak bercampur dengan air dan berat jenisnya lebih rendah, ia akan terapung. Air akan berada sebelah bawah, dan bisa dialirkan kembali ke dalam labu bundar. Minyak esensial perlu dipisahkan dan dianalisis dengan berbagai metode, umpamanya dengan metode kromatografi lapisan tipis.

9.

UJI WARNA PADA KLT (TLC)

9.1. Pendahuluan

Biasanya pelat atau kepingan KLT (TLC) yang dijual di pasaran telah dibubuhi bahan pemberi fluoresens, dan dalam katalog perusahaan penjual ditandai dengan F. seluruh permukaan pelat demikian akan berwarna jika diarahkan pada cahaya UV. Senyawa yang memberikan warna fluoresens yang berbeda dari warna permukaan pelat KLT bisa dilihat juga. Tetapi suatu senyawa yang tidak memberikan warna fluoresens akan menyebabkan pemadaman fluoresens (*fluorescence quencing*). Artinya bintik-bintik demikian akan menjadi gelap. Berbagai senyawa memberikan warna fluoresens yang khas.

Salah satu keuntungan metode KLT ialah kemungkinan melakukan ujian warna yang khas pada bintik-bintik yang telah dipisahkan untuk menentukan adanya gugus fungsi (*functional groups*) tertentu. Tanpa memisahkan senyawa dalam bentuk murni, seseorang bisa menentukan sifat-sifat senyawa yang telah dipisahkan dengan KLT. Keterangan-keterangan demikian bisa membantu memastikan identitas senyawa yang tidak dikenal. Intensitas warna atau fluoresens bisa juga digunakan untuk menentukan kuantitas senyawa. Hampir semua ujian warna (*colour test*) yang digunakan dalam kimia basah bisa digunakan dalam KLT. Dalam rujukan banyak sekali uji warna untuk KLT diberikan. Tidaklah mungkin untuk mempunyai bahan kimia yang diperlukan untuk melakukan semua uji warna ini. Karena

itu dalam petunjuk diberikan beberapa uji warna yang sering digunakan dalam kimia kayu.

Biasanya pelat KLT dikeringkan dahulu sebelum disemprot atau dicelup dengan senyawa uji warna. Senyawa-senyawa fase mobil seharusnya tidak ada lagi pada adsorben. Metode uji warna yang digunakan menentukan pemanasan yang diperlukan untuk memperoleh warna yang baik setelah disemprot atau dicelup.

Salah satu metode yang umum digunakan dalam kimia organik untuk mengenal pasti sesuatu senyawa, ialah membuat turunan dari senyawa, menentukan sifat-sifatnya, dan membandingkannya dengan senyawa yang autentik. Metode ini bisa digunakan di pelat sebelum melakukan pemisahan dengan KLT. Sering dibuat ester, umpamanya asetat, hidrazon, dan benzoat. Metode yang dianjurkan bisa dilihat dalam rujukan (Helmut Jork, *et al.*, 1990).

9.2. Uji Warna Umum Berdasarkan pada Adsorpsi Iodin

Senyawa-senyawa yang mengandung hidrogen dan bersifat lipofilik memberikan warna yang coklat hingga kekuning-kuningan jika diperlakukan dengan uap iodin atau dicelup dengan larutan (0,5-1%0 iodin. Iodin akan diperkaya dalam bintik-bintik dan berwarna coklat.

Beberapa hablur iodin dimasukkan dahulu dalam *vessel* kering dan ditutupi. Setelah beberapa menit uap iodin berwarna ungu akan kelihatan. Kemudian pelat yang telah dikeringkan dan bebas dari fase mobil, dimasukkan ke dalam *vessel*. Setelah beberapa menit iodin yang menguap akan mengkondensasi pada bintik-bintik dan berwarna kuning kecokelatan. Warna ini akan hilang lagi, karena iodin akan menguap. Metode ini bisa digunakan untuk semua senyawa. Sebaiknya metode ini

digunakan setelah pelat KLT diamati dalam UV. Setelah warna iodine hilang, pelat ini bisa digunakan untuk uji warna lain. Harusnya diingat bahwa uap iodine dapat mengganggu kesehatan. Karena itu uji warna dan menghilangkan uap iodine sebaiknya dilakukan dalam “*fume cupboard*”.

9.3. Uji Warna Umum Berdasarkan Oksidasi

Larutan asam sulfat (2-5%) dalam air atau etanol disemburkan pada pelat lapisan tipis silika gel. Kaidah ini tidak sesuai untuk lapisan tipis dari selulosa. Pelat kemudian dipanaskan dalam oven atau di atas pelat pemanas listrik hingga pada suhu dari 95 hingga 140° C selama 1 hingga 20 menit. Diperhatikan supaya warna masih menunjukkan perbedaan. Ada yang menganjurkan penggunaan asam sulfat pekat, atau larutan amonium sulfat dalam metanol (2-5%). Jika pelat dengan amonium sulfat dipanaskan pada suhu 190° C ia akan rusak, dan uap SO₃ akan dibentuk dan mengoksidasi senyawa organik. Pada penyemprotan dengan asam sulfat encer harus diperhatikan supaya masa pemanasan jangan terlampaui lama. Kalau terlampaui lama semua bintik-bintik akan diuraikan, sehingga perbedaan warna tidak kelihatan lagi. Penyemprotan dengan larutan asam sulfat harus dilakukan dalam tempat di mana uap disalurkan (*fume cupboard*) sehingga tidak membahayakan kesehatan. Sebaiknya semasa penyemprotan pelat lapis tipis ditempatkan dalam sebuah karton. Penyemprotan dilakukan dari sebelah muka.

Uap dengan senyawa uji warna serta bahan pelarut sebagian akan diserap oleh karton tersebut dan tidak membahayakan. Jika tidak ada lemari penyerapan (*fume cupboard*) penyemprotan sebaiknya dilakukan di luar. Arah angin harus diperhatikan, jangan sampai yang menyemprot

menghirup uap berbahaya tersebut. Pemanasan sebaiknya dilakukan dalam oven. Karena ada saja larutan asam sulfat yang lekat pada pelat tipis ini, sebaiknya pelat ditempatkan di atas sehelai aluminium. Pelat dibersihkan dengan sehelai tisu tebal setelah dingin. Haruslah selalu diingat bahwa pelat tersebut mengandung asam sulfat. Setiap kali dipegang, tangan haruslah dibasuh dengan banyak air. Asam sulfat, meski dalam jumlah sedikit akan merusak pakaian, terutama yang dibuat dari kapas, atau terdiri dari bahan selulosa. Pelat yang telah dipanaskan kemudian diamati dalam UV gelombang panjang. Berbagai senyawa memberikan warna fluoresens yang khas. Kaidah ini boleh juga digunakan untuk penentuan kuantitatif.

9.4. Uji Warna Gugus Karbonil

Gugus karbonil dapat bereaksi membentuk hidrazon dengan berbagai senyawa hidrazon. Hidrazon biasanya berwarna kuning dan warna ini berubah jika disemprot dengan larutan alkali. Larutan penyemprot terdiri dari campuran 100 mg 2,4-dinitrofenilhidrazin dan 90 ml etanol serta 10 ml asam klorida pekat. Aldehida dan keton bereaksi, biasanya tanpa pemanasan, dengan hidrazon. Gugus karbonil dalam benzokuinon, naftakuinon, dan fenantrenkuinon juga bereaksi dengan hidrazin. Sebaliknya antrakuinon tidak memberikan reaksi.

9.5. Uji Warna Gugus Karboksil

Gugus karboksil menyebabkan senyawa tersebut menjadi asam. Uji warna ialah dengan larutan indikator. Biasanya digunakan larutan bromfenol biru (0,1%) dalam etanol, tanpa pemanasan. Tetapi indikator lain juga boleh digunakan, asal saja diperhatikan warna dan pada pH berapa didapati perubahan warna.

9.6. Uji Warna Gugus Fenol

Banyak sekali uji warna yang dikenal, dan digunakan. Biasanya digunakan uji warna berdasarkan reaksi senyawa fenol yang mempunyai hidrogen bebas pada orto atau para terhadap gugusan hidroksil dengan senyawa amin aromatik yang telah dipendiazoani (*diazotized*). Lazimnya digunakan p-asam sulfonik diazobenzena, dan diazobenzidin. Senyawa yang disebutkan terakhir ini bias menyebabkan kanker, dan karena itu sudah tidak dianjurkan lagi, biarpun hasil reaksi memberikan warna yang khas untuk berbagai fenol alami.

p-Asam sulfonik diazobenzena banyak digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa flavon. Juga larutan AlCl_3 sering digunakan dan diamati dalam UV.

Seperti telah dikemukakan FeCl_3 boleh digunakan juga sebagai uji warna fenol-fenol. Penyemprotan dilakukan dengan larutan dalam etanol (1%) yang dijadikan asam dengan asam klorida. Uji warna fenol bias dilihat selanjutnya dalam rujukan yang telah diberikan.

9.7. Uji Warna Karbohidrat atau Sakarida

Uji warna bertumpu pada pembentukan furfural dari senyawa karbohidrat dan memberikan warna dengan amin aromatik. Yang banyak digunakan ialah anilin dan difenilamin, sebagai amin aromatik dan berbagai asam untuk membentuk furfural. Larutan penyemprot disediakan seperti berikut: 1 hingga 2 g difenilamin dan 1 hingga 2 ml anilin dilarutkan dalam 80 ml metanol atau etanol. Berikan 10 ml asam fosfat dan tambahi metanol atau etanol hingga volume 100 ml. Simpan larutan ini dalam lemari es. Pelat setelah disemprot dipanaskan pada suhu 85-120°C selama 10 hingga 15 menit.

9.8. Uji Warna Asam Amino

Penyemprotan dengan larutan ninhidrin (0,1% dalam etanol) dan kemudian pemanasan sering digunakan. Berbagai asam amino memberikan warna khas.

10.

MEMILIH FASE MOBIL DALAM KLT

Adsorben yang paling banyak digunakan ialah silika gel di atas pelat kaca. Pelat tipis dari aluminium dengan lapisan tipis silika gel bisa juga digunakan. Pelat demikian mudah digunting menjadi ukuran yang lebih kecil. Kegunaannya sama dengan pelat dari kaca.

Pemilihan fase mobil dalam KLT bertumpu pada polaritas pelarut. Bahan pelarut dibagi dalam berbagai kelas polaritas. Heptana dan air mempunyai polaritas yang masing-masing terendah dan tertinggi. Bahan pelarut lainnya berada di antara kedua senyawa ini. Polaritas yang diperlukan bias diperoleh dengan mencampur berbagai bahan pelarut. Rf senyawa ditentukan oleh polaritas fase mobil. Untuk memperoleh pemisahan yang baik, misalnya dari senyawa-senyawa yang hampir sama susunan kimianya diperlukan campuran yang mempunyai selektivitas yang baik. Selektivitas yang baik diperoleh dengan campuran-campuran yang mempunyai polaritas yang hampir sama, tetapi mempunyai susunan kimia yang berbeda.

Daftar polaritas berbagai bahan pelarut dan metode menghitung polaritas sebuah campuran diberikan dalam bukunya Hamilton. Dalam analisis sehari-hari biasanya digunakan campuran dari rujukan. Menurut pengalaman sebaiknya dimulai dengan toluena. Jika bahan pelarut ini terlampau polar, gunakan heptana. Jika toluena tidak cukup polar ganti dengan kloroform. Jika pemisahan juga belum diperoleh, karena Rf terlampau

rendah, gunakanlah campuran toluena: etil asetat: asam format (17:3:0,25). Campuran yang mempunyai polaritas lebih tinggi ialah campuran butanol: asam asetat: air (4:1:5). Campuran dikocok dalam corong pemisah dan gunakan fase sebelah atas.

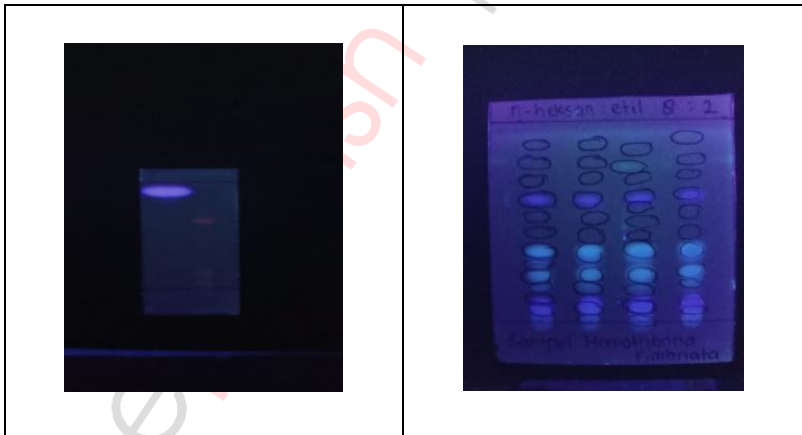
Metode yang juga banyak digunakan, jika menganalisis kumpulan senyawa yang mempunyai polaritas dan juga Rf yang sangat berbeda, ialah metode berikut. Pelat dimasukkan dalam campuran yang paling polar yang hendak digunakan. Biarkan fase mobil sampai naik umpamanya 8 cm. Keluarkan dan keringkan. Seterusnya masukkan dalam campuran pelarut yang mempunyai polaritas lebih rendah. Biarkan fase mobil naik umpamanya 12 cm. Keringkan pelat dan terakhir masukkan dalam campuran yang polaritasnya paling rendah. Biarkan fase mobil naik 16 cm. Keringkan dan lihat dalam UV serta lakukan uji warna. Dengan metode ini senyawa-senyawa yang mempunyai Rf rendah dipisahkan dengan campuran yang paling polar, senyawa dengan Rf sedang dengan campuran yang mempunyai polaritas sedang, serta senyawa yang Rf-nya tinggi dipisahkan dengan campuran fase mobil yang paling tidak polar.

11.

DOKUMENTASI DALAM KLT

Setelah analisis KLT selesai hasilnya akan dicatat. Metode yang paling mudah ialah membuat Fotostat dan memberikan keterangan-keterangan tambahan dalam Fotostat. Terutama tentang warna. Jika hendak dibuat foto, sebaiknya dibuat berwarna.

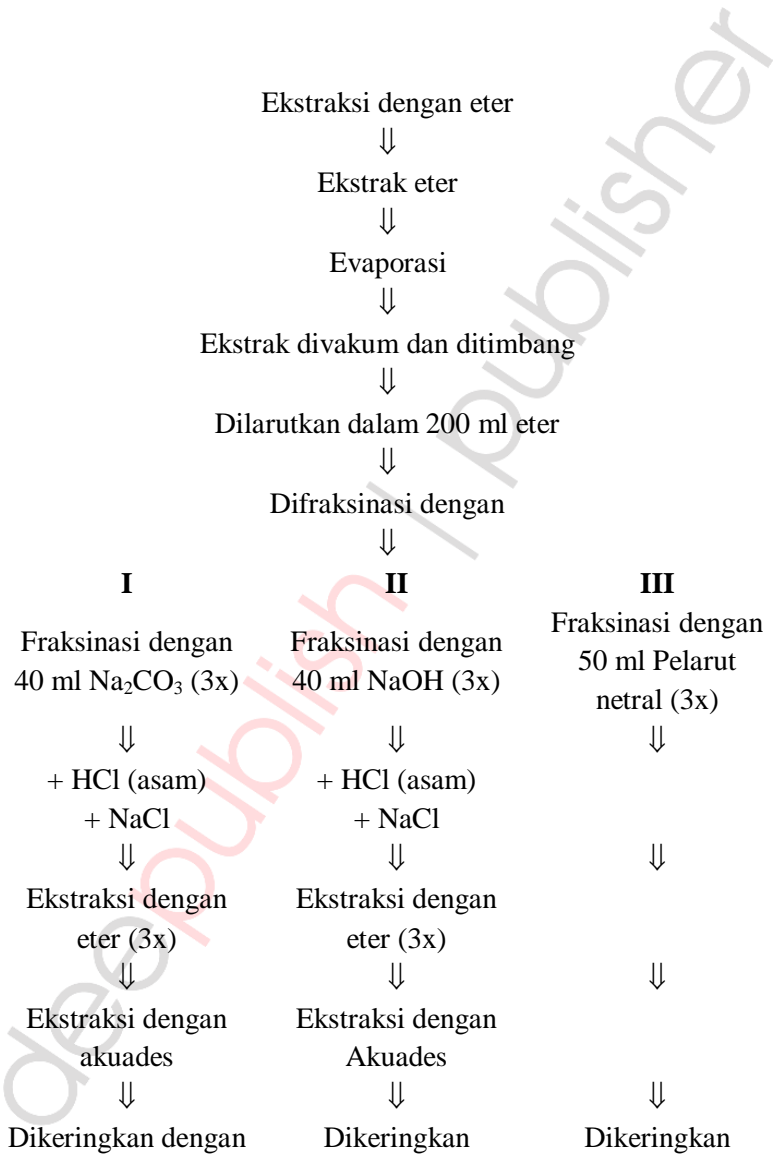
Contoh pengujian sampel dengan TLC, dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 1. Contoh Analisis Sampel (Ekstrak) dengan Analisis Kromatografi Lapisan Tipis (*Thin Layer Chromatography*).

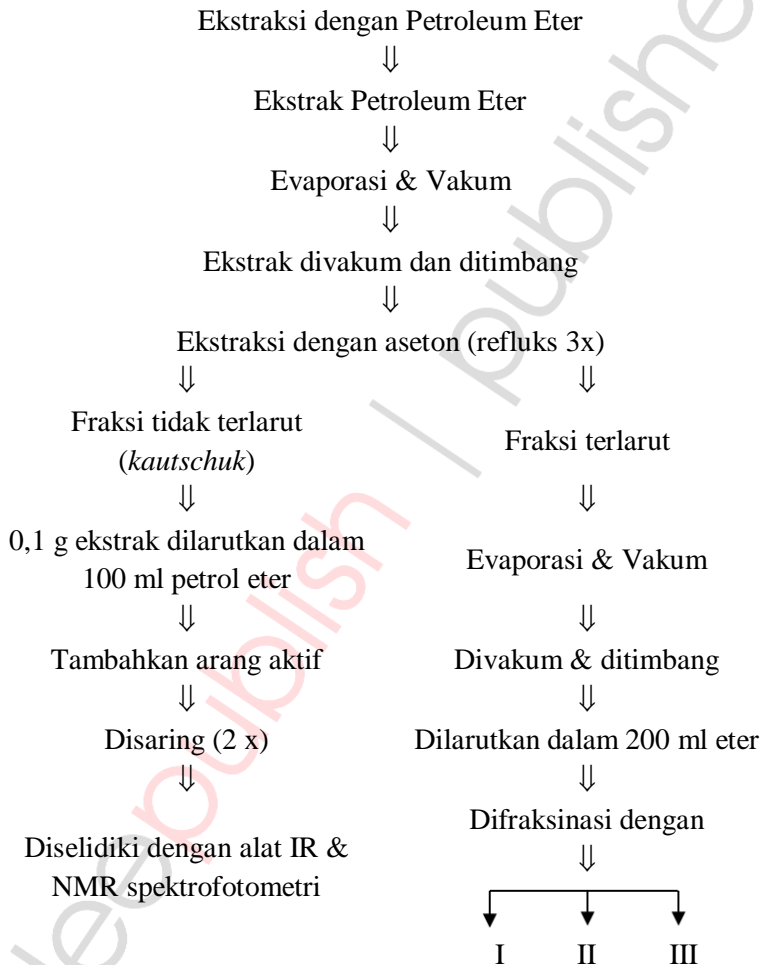
Seperti telah dikemukakan, metode KLT ialah metode relatif. Karena itu senyawa murni sebagai perbandingan selalu diperlukan. Dua senyawa dianggap sama, jika kedua-duanya mempunyai R_f dan uji warna yang sama dalam sekurang-kurangnya 3 campuran fase mobil. Sebaiknya dibuat juga turunannya. Juga untuk KLT turunan harus ada persamaan dalam 3 campuran fase mobil. Spektrum UV dari senyawa yang telah dipisahkan bisa menguatkan identifikasi demikian.

ALUR EKSTRAKSI DENGAN DIETHYL ETER





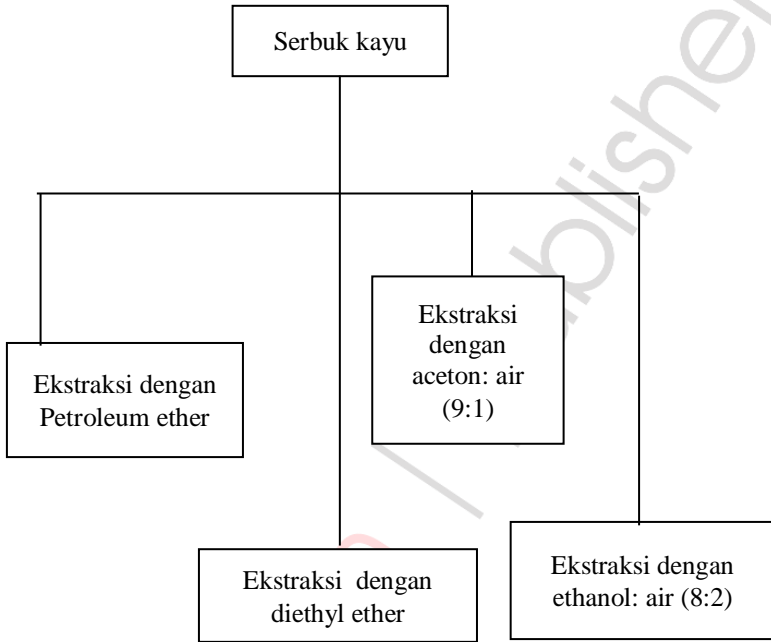
ALUR EKSTRAKSI DENGAN PETROL ETER



Sambungan...

I	II	III
Fraksinasi dengan 40 ml Na_2CO_3 (3x)	Fraksinasi dengan 40 ml NaOH (3x)	Fraksinasi dengan 50 ml Pelarut netral (3x)
⇓	⇓	⇓
+ HCl (asam) + NaCl	+ HCl (asam) + NaCl	⇓
⇓	⇓	⇓
Ekstraksi dengan eter (3x)	Ekstraksi dengan eter (3x)	⇓
⇓	⇓	⇓
Ekstraksi dengan akuades	Ekstraksi dengan Akuades	⇓
⇓	⇓	⇓
Dikeringkan dengan Na_2SO_4	Dikeringkan dengan Na_2SO_4	Dikeringkan dengan Na_2SO_4
⇓	⇓	⇓
Disaring	Disaring	Disaring
⇓	⇓	⇓
Dievaporasi & divakum	Dievaporasi & Divakum	Dievaporasi & divakum
⇓	⇓	⇓
Ditimbang	Ditimbang	Ditimbang
⇓	⇓	⇓
Dilarutkan dalam etanol (0,2%)	Dilarutkan dalam etanol (0,2%)	Dilarutkan dalam etanol (0,2%)
⇓	⇓	⇓
KLT	KLT	KLT

DIAGRAM EKSTRAKSI KAYU



REFERENSI

- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. 1994. "Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods, vol. Ib, Physical And chemical Detection Methods: Activation Reactions, Reagent Sequences, Reagents II (English)". *VCH*, (ISBN 3-527-28205-X). xvi + 496 pp.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., Thorburn, Burns D. 1990. "Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods. Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I". *VCH*, Volume 1a (English), (ISBN 3-527-27834-6), xv + 464 pp.
- TAPPI Standard – T 9 m – 54. *Holocelulosa in Wood*.
- TAPPI Standard 264 om – 88. *Preparation of Wood for Chemical Analysis (Including Procedures for Removal of Extractive and Determination of Moisture Content*.
- TAPPI Standard T 13 m – 54. *Lignin in Wood*.
- TAPPI Standard- T 6 M – 59. *Alcohol – Benzene Solubility of Wood*.

TENTANG PENULIS



Enih Rosamah, lahir di Sumedang pada tanggal 17 Agustus 1966. Ia menyelesaikan program S-1 Fakultas Kehutanan di Institut Pertanian Bogor tahun 1990, Pendidikan Magister Sains (M.Sc. for. prof.) ditempuh di Georg-August Universität Göttingen, Jerman tahun 1997. Terakhir, menempuh jenjang Pendidikan Doktor (S-3) di Georg-August Universität Göttingen, Jerman tahun 2003 dengan bidang keahlian Teknologi Hasil Hutan khususnya Kimia Kayu (tumbuhan berkayu).

Sejak tahun 1991 hingga sekarang, bekerja sebagai dosen di Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman Samarinda, Kalimantan Timur.