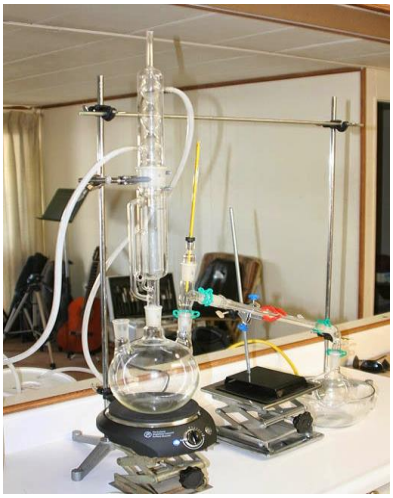
MODUL PRAKTIKUM

IDENTIFIKASI SENYAWA

FITOKIMIA



PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA

2020

PETUNJUK UMUM

1. **Tujuan Melakukan Praktikum**

   Melihat sendiri hasil praktikum.

   Membandingkan hasil percobaan dengan pendapat-pendapat/teori-teori yang ada dan kemudian mengambil kesimpulan akhir.

   Membantu dalam mempelajari efek yang ditimbulkan / diharapkan.

2. **Cara Pelaksanaan**

   Modul Praktikum digunakan sebagai pegangan dalam pelaksaan praktikum secara mandiri.

   Pada setiap kegiatan selalu dilakukan pencatatan pada buku catatan harian (log book).

   Pada setiap pelaksanaan praktikum, selalu didampingi oleh dosen dan analis laboratorium.

3. **Penilaian/Evaluasi**

   Penilaian dilakukan terhadap proses dan hasil akhir praktikum yang dilakukan.

   Pada akhir pelaksanaan praktikum dilakukan pembuatan laporan praktikum.

4. **Aturan Pelaksanaan**

   Lakukan praktikum sebaik-baiknya dan dengan tertib.

   Adakan persiapan secukupnya tiap kali akan melakukan praktikum, agar percobaan-percobaan yang dilakukan dapat bermanfaat.

   Ambillah pelajaran sebanyak mungkin dari percobaan yang dilakukan.

   Berhati-hatilah menggunakan alat-alat dan bahan-bahan praktikum.

PRAKTIKUM IDENTIFIKASI SENYAWA FITOKIMIA

PENGANTAR

Ekstrak adalah suatu zat yang dihasilkan dari proses ekstraksi suatu bahan mentah secara kimiawi. Senaywa kimia yang dapat diekstrak meliputi senyawa aromatic, minyak atsiri, ester, dan sebagainya yang kemudian dapat menjadi bahan baku proses dalam suatu industri, penelitian di kalangan akademisi, atau digunakan secara langsung oleh masyarakat. Secara umum, bahan baku yang digunakan untuk ekstrak berasal dari tumbuh – tumbuhan yang memiliki potensi dikembangkan sebagai sediaan obat herbal atau diisolasi senyawa murninya.

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan yang tidak saling larut, biasanya air dan pelarut organik. Proses ekstraksi suatu bahan dapat dilakukan berdasarkan teori mengenai "Penyarian" yaitu peristiwa pemindahan massa atau secara teori yaitu zat aktif yang awalnya berada dalam sel, ditarik oleh suatu cairan penyari sehingga terjadi larutan zat aktif dalam cairan penyari tersebut yang masih mengandung berbagai macam senyawa.

ALAT DAN BAHAN

1. **Perkolator**

   Alat yang digunakan untuk penyarian yang dilakukan dengan cara mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang sebelumnya telah dibasahi

Gambar 1. Perkolator

2. Rotary evaporator

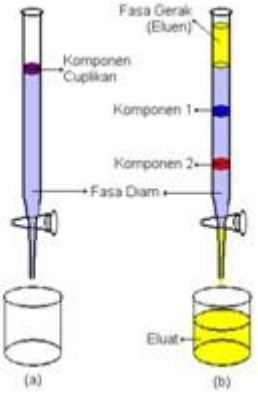
   Alat ini biasanya berfungi untuk mengubah sebagian atau keseluruhan sebuah pelarut dari sebuah larutan yang awalnya berbentuk cair menjadi uap dengan prinsip kerja menukar panas dan cairan dengan menggunakan prinsip destilasi (pemisahan). Dengan

menggunakan alat ini biasanya untuk memisahkan atau menguapkan cairan penyari dari bahan yang disari sehingga memperoleh ekstrak yang sebagian besar banyak digunakan dalam penelitian ilmiah.

Gambar 2. Rotary evaporator

3. Kolom Kromatografi

   Metode ini digunakan untuk memurnikan bahan kimia tunggal dari campurannya. Metode dengan alat ini sering digunakan untuk aplikasi preparasi pada skala kecil hingga besar. Prinsip kerjanya berdasarkan pada perbedaan migrasi komponen-komponen senyawa dari fase diam oleh pengaruh fase gerak. Kolom yang disebut berupa tabung kaca dengan diameter tertentu yang bagian bawahnya memiliki lubang pengalir.



Gambar 3. Kolom Kromatografi

4. Penotol mikro

   Alat ini digunakan untuk menotolkan sejumlah bahan ekstrak tertentu pada suatu lempeng yang disebut Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ukurannya bervariasi dari 1 µL; 2 µL; dan 5µL.

5. Pipet tetes

   Pipet tetes merupakan jenis pipet berupa pipa kecil yang terbuat dari kaca atau plastic dan pada bagian ujung bawahnya berbentuk runcing, sedangkan pada ujung atasnya ditutupi oleh karet. Pipet tetes berfungsi untuk mengambil cairan dengan skala kecil

6. Plat tetes

   Alat ini berfungsi sebagai media/tempat mereaksikan zat-zat uji, namun dalam jumlah yang kecil dan dapat pula digunakan untuk menentukan pH larutan asam-basa.

7. Lampu UV

   Alat ini digunakan untuk melihat kromatogram pada KLT. Prinsipnya, noda akan Nampak berupa pendaran apabila dikenai dengan sinar ultra UV pada Panjang gelombang 254 dan 360 nm.

8. Vial

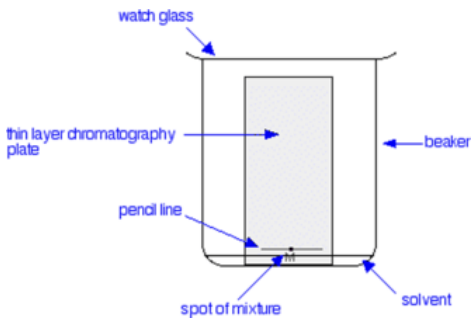
   Vial merupakan suatu benda penampung cairan, bubuk, atau tablet sediaan farmasi yang biasanya terbuat dari kaca atau plastic. Biasanya peneliti menggunakan vial sebagai tempat menampung sampel atau bahan penelitian, walaupun biasanya juga digunakan untuk melakukan reaksi kimia.

9. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

   Suatu Teknik kromatografi sederhana yang digunakan untuk memisahkan campuran berdasarkan volatilnya (daya uapnya). KLT dapat dilakukan pada selembar kaca, plastic, atau aluminium foil yang dilapisi dengan lapisan tipis bahan adsorben (berbahan silika gel), aluminium oksida, atau selulosa. Lempengan tersebut digunakan untuk memisahkan zat-zat kimia yang diidentifikasi pada suatu ekstrak berdasarkan prinsip pemisahan kromatografi. Biasanya digunakan sebagai alat untuk mengetahui kandungan fitokimia suatu bahan ekstrak.

10. Bejana kromatografi

    Tempat mengelusi lempeng KLT yang terbuat dari kaca pejal yang tidak memiliki sambungan di sudut-sudutnya. Bejana ini memiliki penutup yang terbuat dari kaca atau logam tahan korosi (karat). Bejana ini menampung lempeng berukuran 200 ×200 mm dan tertutup rapat.



Gambar 4. Prinsip Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

11. Kertas saring

    Kertas semi-permeabel yang dipotong melingkar dan ditempatkan dalam suatu corong pemisah, untuk menyaring kotoran agar tidak larut dan memungkinkan larutan dapat terpisahkan melalui pori-pori kertas. Dalam kromatografi, kertas saring memiliki kecepatan penyerapan jenis kertas adalah dari 6 cm hingga 18 cm dan memiliki ketebalan kertas dari 0.17 mm hingga 0.93 mm.

12. Pinset

    Berfungsi untuk menjepit benda-benda berukuran kecil atau jaringan tertentu. Namun, sebelum digunakan untuk sample, pinset harus disterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan klorin 0.5% selama kurang lebih 10 menit. Setelah itu, dilanjutkan dengan pencucian menggunakan sabun dan sikat, bilas dengan air bersih. Atau bisa juga disterilisasi secara fisik dengan menggunakan *autoclave* .

13. Tabung reaksi

    Banyak digunakan oleh peneliti atau akademisi untuk menampung, mencampur, atau memanaskan sejumlah kecil bahan kimia padat maupun cair, terutama untuk uji kualitatif.

14. Seperangkat alat berbentuk gelas

    Beaker glass, Erlenmeyer, dsb

15. Alat penyemprot lempeng KLT

    Alat ini digunakan untuk menyemprotkan penampak noda pada lempeng KLT.

16. Destilasi stahl

    Metode yang sederhana dan biasanya menggunakan pelarut air karena air memiliki titik didih lebih besar dari minyak atsiri sehingga proses pemisahan dengan destilasi dapat dilakukan.

17. Ekstraktor Soxhlet

    Biasanya digunakan untuk ekstraksi lipid dari bahan padat, dan digunakan jika suatu senyawa yang diinginkan memiliki tingkat kelarutan yang terbatas dalam suatu pelarut.

Gambar 5. Ekstraksi Soxhlet

ZAT – ZAT KIMIA YANG DIGUNAKAN DALAM PRAKTIKUM FITOKIMIA

1. Pelarut pengekstraksi atau komponen penyusun pada KLT

   Metanol, Etanol, Etil asetat, Kloroform, Air, Heksana, Butanol, Toluena

2. Asam Klorida (HCl)

   Digunakan sebagai penetral basa dan memberikan suasana asam ataupun untuk proses hidrolisis.

3. Pereaksi Wagner

   Digunakan untuk mengendapkan dan mendeteksi senyawa alkaloid.

4. Pereaksi Mayer

   Sama halnya dengan pereaksi Wagner, pereaksi ini juga dapat digunakan untuk mengendapkan alkaloid.

5. Ammoniak (NH_4OH)

   Amoniak murni biasanya digunakan sebagai penampak noda pada identifikasi flavonoid dengan menggunakan KLT, sedangkan amoniak encer untuk memberikan suasana basa pada suatu sampel.

6. Dragendorff

   Reagen yang digunakan untuk mendeteksi senyawa Alkaloid dalam suatu sampel uji. Jika terdapat alkaloid pada suatu sampel maka dapat bereaksi dengan reagen Dragendorff dan akan menghasilkan endapan berwarna jingga kemerahan.

7. Asetat anhidrad

   Anhidrat dari asam asetat yang memiliki struktur molekul simetris dan berguna sebagai pelarut senyawa organic, fungisida, dan baktrisida. Selain itu berperan dalam proses

asetilasi, pembuatan sediaan aspirin dan acetylmorphine.

8. Anisaldehid sulfat

   Pereaksi semprot yang bersifat destruktif karena pereaksi ini mampu memecah senyawa pada plat KLT agar dapat diamati oleh sinar UV.

9. Antimon klorida

   Pereaksi ini digunakan sebagai penampak noda pada identifikai senyawa terpenoid dan steroid.

10. $FeCl_3$

    Larutan ini digunakan sebagai penampak noda untuk senyawa golongan polifenol, yang memiliki reaksi warna ungu tua atau biru muda.

11. KOH

    Pemberi suasana basa sebagai penampak noda pada identifikasi senyawa golongan antrakinon.

Metode Ekstraksi

1. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang melakukan perendaman suatu bahan tanaman (baik berbentuk kasar atau bubuk) dalam wadah tertutup dengan ditambahkan pelarut tertentu untuk menarik zat aktif yang terkandung di dalam sel tumbuhan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel. Persitiwa ini dapat terjadi berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Proses maserasi biasanya berlangsung selama 3 hari pada suhu kamar (Nn, 2015). Selama maserasi berlangsung, dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari.

Endapan yang diperoleh dari maserasi dipisahkan dan filtratnya dipekatkan dengan mesin *Rotary evaporator*. Kelebihan dari metode ekstraksi ini adalah (1) unit alat yang digunakan relative sederhana, (2) biaya operasional relative murah. (3) prosesnya relative hemat dan tanpa proses pemanasan. Namun begitu, proses ini juga memiliki kekurangan seperti (1) proses penyarian dapat tidak sempurna akibat zat aktif yang hanya mempu terekstaksi sekitar 50% dan (2) prosesnya yang lama dan butuh waktu beberapa hari untuk memperoleh jumlah ekstrak tertentu.

Pemilihan pelarut untuk proses ekstraksi ini juga harus diperhatikan antara lain harus memiliki daya tahan dalam melarutkan oleoresin, titik didih, sifat toksik, mudah atau tidaknya terbakar, dan pengaruhnya terhadap alat peralatan yang digunakan sebaga ekstraksi. Pelarut heksan dapat direkomendasikan untuk digunakan sebagai pelarut pada metode ekstraksi ini karena

sifatnya yang non pola jadi lebih mudah melarutkan oleoresin dan mempermudah proses ekstraksi jika dibandingkan pelarut lainnya. Secara umum, maserasi menggunakan pelarut non air atau non polar karean ketika simplisia yang akan dimaserasi direndam, maka cairan penyari akan dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel yang sudah penuh dengan zat aktif dan karena adanya pertemuan antara zat aktif dan penyari tersebut terjadilah prose pelarutan sehingga penyari yang masuk ke dalam sel akhirnya akan mengandung zat aktif. Akibat adnaya perbedaan konsentrasi tersebut maka akan muncul gaya difusi, yaitu larutan yang terpekat akan didesak keluar untuk mencapai keseimbangan konsentrasi antara zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses keseimbangan akan berhenti setelah terjadi kejenuhan dan dalam kondisi ini dapat dinyatakan bahwa proses ekstraksi selesai dan zat aktif yang ada di dalam dan di luar sel memiliki konsentrasi yang sama yaitu amsing-masing 50%.

Maserasi juga dapat dimdifikasi dengan beberapa metode antara lain :

a) Digesti : dilakukan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan lemah yaitu pada suhu berkisar 40 - 50ºC.
b) Mesin pengaduk : yaitu dengan mesin pengaduk yang berputar terus-menerus dan dapat mempersingkat prose maserasi menajdi 6 – 24 jam saja.
c) Remaserasi :seluruh serbuk simplisia di maserasi dengan cairan penyari pertama sesudah diendapkan, dituangkan dan diperas, ampas dimaserasi kembali dengan cairan penyari kedua.
d) Maserasi melingkar : dengan cara ini, penyari selalu mengalir secara berkesinambungan melalui serbuk simplisia dan melarutkan zat aktifnya.

2. Perlokasi

Perlokasi merupakan suatu metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Proses ini berdasarkan pada difusi yang berlangsung berdasarkan oleh kecepatan, kuantitas pelarut, dan konstanta pelarut. Metode ini mudah dilakukan dan dapat dijadikan rekomendasi dalam proses ekstraksi senyawa tanaman.

Perlokasi memiliki prinsip yaitu serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder yang di bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dapat dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, sehingga cairan penyari akan melarutkan zat-zat aktifnya hingga mencapai keadaan jenuh. Pergerakan tersebt disebabkan oleh adanya gaya berat dai serbuk dan cairan diatasnya dan dikurangi dengan gaya yang dimiliki kapiler yang cenderung untuk menahan. Setelah massa didiamkan selama 24 jam dalam percolator, maka keran dapat dibuka dan diatur sehingga cairan ekstrak menetes 1 mL tiap menitnya. Hasil akhir dari perlokasi dapat dilakukan

dengan pemeriksaan zat aktif secara kualitatif.

Penggunaan metode perlokasi ini lebih baik digunakan dibandingkan maserasi karena (1) lebih mudah digunakan dan sederhana, (2) prosedur pilihan untuk kebanyakan metode ekstraksi senyawa aktif tanaman, dan (3) dapat dilakukan baik pada skala laboratorium maupun industri. Sedangkan kerugian dari metode ini antara lain (1) simplisia harus dibasahi terlebih dahulu sebelum dimasukkan dalam perkularor, (2) massa simplisia dalam perkulator tergantung pada tinggi perkulator, (3) Simplisia dapat memadat sesudah beberapa kali dilakukan esktraksi dan hal ini dapat menghalangi kelancaran aliran pelarut, dan (4) perolehan pelarut yang tertahan di dalam ampas sering memerlukan proses tambahan dan hal yang sama berlaku untuk mengeluarkan ampas dan menarik bahan aktif dari ampas. Contoh dari proses perlokasi dapat dilihat pada Gambar 6 di bawah ini.

Gambar 6. Proses perlokasi (Sumber : Tim B2P2TOOT, Litbang, Kemkes)

3. Ekstraksi menggunakan Soxhlet

Metode ekstrasi Soxhlet adalah metode ekstraksi padat-cair yang sering digunakan dlaam skala laboratorium sintetik dan analitik dan diperlukan bila senyawa yang diinginkan hanya menunjukkan kelarutan terbatas dalam pelarut, dan pengotornya tidak larut dalam pelarut tersebut. Prinsip kerja dengan menggunakan metode ini adalah menggunakan pelarut selalu baru dalam prose ekstraksinya sehingga ekstraksi yang kontinyu dengan adanya jumlah pelarut konstan yang juga dibantu dengan konsensor.

4. Ekstraksi dengan menggunakan gas superkritis (CO_2)

Metode ekstraksi ini disebut juga dengan Ekstraksi Fluida Super Kritis dan banyak digunakan untuk ekstraksi murni minyak atsiri, bahan farmasi, dan pigmen. Tujuan penggunaan metode

ini adalah karena lebih efisien dan selektif pada molekul tertentu dari tumbuhan dengan pemurnian pasca ekstraksi minimum. Dalam metode ini menggunakan gas CO_2 karena murni, stabil, dan pelarut non-polar. Selain itu tak berwarna, tidak berbau, tanpa residu, aman, ramah lingkungan, tersedia dimana-mana. Keuntungan dari metode ini adlaah (1) degradasi molekul tak stabil lebih minimum, (2) Seletivitas tinggi, (3) mudah dikontrol tekanan dan teperaturnya, dan (4) ekstraksi lebih cepat dan tingkat kekentalan lebih rendah. Sedangkan kerugiannya (1) biaya relative tinggi dan (2) perlu operator dengan skill tinggi dalam pengoperasiannya

A. SKRINING FITOKIMIA

Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah agar mahasiswa mampu memahami cara pembuatan ekstrak untuk skrining fitokimia. Bahan yang digunakan adalah simplisia X (bahan alam tertentu dapat ditentukan saat praktikum). Adapun prosedur dalam skrining fitokimia adalah:

1. Sebanyak 500 gram serbuk kering dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah dilengkapi dengan pengaduk magnetic *(magnetic stirrer)*
2. Serbuk tersebut kemudian ditambahkan etanol atau methanol 80% sebanyak 4.5x bobot total serbuk
3. Serbuk yang telah terbasahi dengan pelarut dipanaskan selama 2 jam pada suhu 50 - 60ºC dengan pengadukan diatas lempeng pemanas berpengaduk *(hot plate stirrer)*
4. Filtrat dipisahkan dari ampas dengan penyaringan. Filtrat yang telah diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* atau dengan cara dipanaskan diatas penangas air sehingga menghasilkan ekstrak kental yang siap digunakan untuk Skrining fitokimia.

B. IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN ALKALOID

Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah agar mahasiswa memahami cara identifikasi senyawa golongan alkaloid. Bahan yang digunakan adalah ekstrak simplisia bahan “X”. Adapun prosedur kerja yang dilakukan yaitu:

1. **Preparasi sampel**

   Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan terlebih dahulu di atas porselin. Residu yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCl 2 N. Kemudian, larutan yang telah diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama (1) ditambahkan 3 tetes HCl 2 N (sebagai Blanko). Tabung kedua (2) ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff, dan tabung ketiga (3) ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer.

2. **Hasil yang terbentuk**

   Hasil yang terbentuk akan menyerupai endapan berwarna jingga pada tabung kedua (2) dan endapan berwarna kuning pada tabung ketiga (3) yang menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder berupa Alkaloid pada ekstrak .

3. **Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

   Tabung pertama (blanko) ditambahkan NH_4OH 28% hingga larutan menjadi basa. Kemudia diekstraksi dengan 5 mL kloroform free water dan disaring. Filtrat diuapkan hingga kering kemudian dilarutkan dalam methanol dan siap untuk diujikan dengan KLT dengan persiapan seperti dibawah ini :

   - Fase diam : Kiesel Gel GF 254
   - Fase gerak : Etil asetat – methanol – air (9 : 2 : 2)
   - Penampak noda : Pereaksi Dragendorf

   Indikator warna yang muncul berwarna jingga yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

C. IDENTIFIKASI GLIKOSIDA SAPONIN, TRITERPENOID, DAN STEROID

Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah agar mahasiswa mampu memahami cara identifikasi senyawa dari golongan glikosida saponin, triterpenoid, dan steroid. Bahan yang digunakan adalah ekstrak simplisia bahan "X". Adapun prosedur kerja yang dilakukan yaitu:

a. Saponin

- **Uji Busa**

  Ekstrak kental yang dijadikan bahan ditimbang sebanyak 1 gr dan ditambahkan dengan air hangat serta dikocok vertical selama ± 10 detik. Busa akan terbentuk dengan tinggi sekitar 1 – 10 cm dan tidak kurang dari 10 menit yang menunjukkan adanya saponin dalam bahan ekstrak, walaupun ditambahkan dengan 1 tetes HCl 2 N (Depkes RI, 1995).

- **Uji menggunakan KLT**

  Ekstrak diambil sebanyak 0,5 gram dan ditambahkan 5 mL HCl 2 N. Panaskan hingga mendidih dan tutup menggunakan corong yang telah berisi kapas basah selama 2 jam guna menghidrolisis saponin. Dinginkan, dan tambahkan dengan ammonia sebagai penetral, kemudia tambahkan dengan 3 mL n-heksana sebanyak 3 kali dan uapkan hingga 0,5 mL. Totolkan pada pelat KLT.

  - Fase diam : Kiesel Ggel GF 254
  - Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4 : 1)
  - Penampak noda : - Anisaldehida asam sulfat dan Antimon klorida

  Indikator warna yang muncul jika ekstrak mengandung saponin adalah (1) warna ungu untuk anisaldehida asam sulfat dan (2) merah muda untuk antimon klorida.

b. Triterpenoid dan Steroid

- **Uji reaksi Liebermann-Burchard**

  Larutan uji diuapkan sebanyak 2 mL dalam cawan porselin. Residu yang muncul lalu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dan ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambahkan dengan asam sulfat pekat sebanyak 2 mL melalui dinding tabung. Campuran ini akan menghasilkan cincin berwarna kecoklatan atau violet pada batas larutan yang menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan cincin berwarna biru kehijauan menunjukkan adanya senyawa steroid (Ciulei, 1984).

- **Identifikasi menggunakan KLT**

  Tambahkan ekstrak secukupnya dengan beberapa tetes etanol. Diaduk hingga larut dan totolkan pada fase diam. Uji KLT ini menggunakan komposisi sebagai berikut :

- Fase diam : Kiesel Gel GF 254
- Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4 : 1)
- Penampak noda : Anisaldehida asam sulfat

Senyawa triterpenoid dan steroid akan ditunjukkan dengan adanya warna merah keunguan atau ungu.

D. IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID

Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah agar mahasiswa mampu memahami cara identifikasi senyawa flavonoid. Bahan yang digunakan adalah ekstrak simplisia bahan "X". Adapun prosedur kerja yang dilakukan yaitu:

- **Reaksi warna**

  Sebanyak ±1 mL larutan uji diuapkan hingga kering dan sisanya dibasahkan menggunakan aseton P dan. Ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P serta dilanjutkan dengan pemanasan di atas penangas air dan perhatikan nyala api agar tidak berlebihan. Ditambahkan Eter P sebanyak 10 mL. Larutan lalu diamati di bawah sinar UV dengan Panjang gelombang 366 nm. Jika terlihat warna dengan fluorensi kuning akan menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Depkes, 1995).

- **Menggunakan KLT**

  Pada uji KLT tambahkan ekstrak secukupnya dan ditotolkan pada fase diam, dengan komposisi KLT sebagai berikut :

  - Fase diam : lapisan tipis selulose (diganti Kiesel Gel GF 254)
  - Fase gerak : butanol-asam asetat glacial-air (4 : 1 : 5)
  - Penampak noda : pereaksi sitrat borat atau uap ammonia

Flavonoid ditunjukkan dengan adanya noda berwarna kuning, sedangkan untuk warna kuning yang dihasilkan dari uap ammonia akan menghilang secara perlahan karena mengalami penguapan. Lapisan atas yang muncul pada fase gerak dapat digunakan untuk mengevaluasi senyawa flavonoid.

E. IDENTIFIKASI SENYAWA POLIFENOL DAN TANIN

Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah agar mahasiswa mampu memahami cara identifikasi senyawa polifenol dan tanin. Bahan yang digunakan adalah ekstrak dari bahan "X". Adapun prosedur kerja yang dilakukan yaitu:

- **Reaksi warna**

  Untuk mengetahui kandungan senyawa polifenol dan tannin dapat dilakukan dengan cara ekstrak ditetesi dengan larutan $FeCl_3$ dan diamati perubahan warna yang terjadi. Jika warna yang muncul berwarna hijau biru hingga hitam maka terdapat senyawa polifenol, sedangkan jika muncul warna hijau kehitaman maka terdapat senyawa tannin.

- **Menggunakan KLT**

  Sedikit larutan ekstrak digunakan untuk pemeriksaan KLT dengan komposisi sebagai berikut

  - Fase diam : Kiesel gel GF 254
  - Fase gerak : Kloroform – etil asetat (1 : 9)
  - Penampak noda : Pereaksi $FeCl_3$

Senyawa polifenol ditunjukkan dengan adanya warna hitam pada sampel yang dianalisis.

F. IDENTIFIKASI SENYAWA ATRAKINON

Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah agar mahasiswa mampu memahami cara identifikasi senyawa atrakinon. Bahan yang digunakan adalah ekstrak dari bahan "X". Adapun prosedur kerja yang dilakukan yaitu:

- **Reaksi warna**

  Analisis dapat dilakukan dengan uji Borntrager yaitu sebanyak 0,3 gram diekstraksi dengan 10 mL air suling dan disaring, lalu filtrat yang diperoleh diekstraksi kembali dengan 3 mL toluene dalam corong pemisah. EKstraksi dilakukan sebanyak dua kali dan kemudian pada fase toluene dikumpulkan dan dibagi menjadi dua bagian yang disebut dengan larutan V1 dan V2. Larutan V1 disebut sebagai blanko dan larutan V2 ditambahkan dengan ammonia dan dikocok. Senyawa atrakinon dapat ditunjukkan dengan warna merah.

- **Dengan KLT**

  Sampel ekstrak yang digunakan ditotolkan pada fase diam dengan kondisi KLT sebagai berikut :

  - Fase diam : Kiesel gel GF 254
  - Fase gerak : toluene – etil – asam asetat (75 : 24 : 1)
  - Penampak noda : tambahkan larutan 10% KOH dalam methanol

Jika muncul noda berwarna kuning, kuning coklat, merah ungu atau hijau ungu maka bahan ektrak menunjukkan adanya senyawa antrakinon.

DAFTAR PUSTAKA

1. Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. (2013). Skrining fitokimia ekstrak metanol rimpang bangle (Zingiber purpureum Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, *2*(4), 279691.
2. Koirewoa, Y. A., Fatimawali, F., & Wiyono, W. (2012). Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dalam daun beluntas (Pluchea indica L.). *Pharmacon*, *1*(1).
3. Bintoro, A., Ibrahim, A. M., Situmeang, B., Kimia, J. K. S. T. A., & Cilegon, B. (2017). Analisis dan identifikasi senyawa saponin dari daun bidara (Zhizipus mauritania L.). *Jurnal Itekima*, *2*(1), 84-94.
4. Illing, I., Safitri, W., & Erfiana, E. (2017). Uji fitokimia ekstrak buah dengen. *Dinamika*, *8*(1), 66-84.
5. Hayati, E. K., Fasyah, A. G., & Sa'adah, L. (2010). Fraksinasi dan identifikasi senyawa tanin pada daun belimbing wuluh (Averrhoa bilimbi L.). *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*.

1.