**PENUNTUN PRAKTIKUM**

**FITOKIMIA**

****

**Penyusun :**

**Dr. Roihatul Muti’ah, S.F., M.Kes, Apt**

**PROGRAM STUDI S2 BIOLOGI**

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM**

**MALANG**

**2019**

**TUGAS 1**

**IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN ALKALOIDA**

**( Ekstrak *Piper nigrum* L)**

* 1. **TUJUAN**

Mahasiswa mampu melakukan identifikasi senyawa golongan alkaloida dalam tanaman.

* 1. **PROSEDUR KERJA**

1. Preparasi sampel
2. Ditimbang 20 gr serbuk, ditambah etanol 100 ml sampai larut dan terendam. Kemudian di UAE (Ultrasonic Assay Ekstraction) selama 2-3 menit dengan ulangan 3 kali untuk memecah partikel serbuk tersebut. Setelah itu disaring untuk memisahkan serbuk dengan larutan, diambil 5 ml hasil saringan kemudian ditambah 5 ml HCl 2N, dipanaskan di atas pemanas (bunsen) selama 2-3 menit, sambil diaduk.
3. Setelah dingin ditambah 0.3 gram NaCI (diasamkan) , diaduk rata
4. Filtrat ditambah 5 ml HCI 2N, Filtrat di bagi tiga bagian dan di sebut sebagai larutan IA, IB, IC.
5. Reaksi pengendapan
6. Larutan IA ditambah pereaksi Mayer 4 ml, larutan IB ditambah dengan pereaksi Wagner 2 ml dan larutan IC dipakai sebagai blanko
7. Adanya kekeruhan atau endapan menunjukkan adanya alkoloid.

(pada larutan IA dan IB terbentuk endapan, sedangkan pada blanko tidak terdapat endapan. Hal ini menunjukkan bahwa pada larutan serbuk terdapat senyawa alkaloid.

1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
2. Larutan IC ditambah NH4OH pekat 28% sampai larutan menjadi basa dengan tujuan untuk menarik alkaloid, kemudian ditambahkan dengan 5ml kloroform (dalam tabung reaksi) untuk melarutkan alkaloid. Terbentuk endapan pada NH4OH dengan Kloroform (CHCL3). Endapan kloroform berada di bawah karena memiliki berat jenis yang lebih besar dari pada NH4OH.
3. Filtrat (Fase CHCL3) di uapkan di lemari asam sampai kering, kemudian ditambahkan (1 mL) dan siap untuk pemeriksan dengan KLT.

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : eluen: CHCL3 – Etil asetat (1:1)

Penampak noda: Pereaksi Dragendorf

1. Jika timbul warna jingga menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak.

**TUGAS II**

**IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN GLIKOSIDA SAPONIN,**

**TRITERPENOID DAN STEROID**

**(Filtrat *Piper nigrum* L)**

**II.1. TUJUAN**

Mahasiswa mampu melakukan identifikasi senyawa golongan glikosida saponin, triterpenoid dan steroid dalam tanaman.

**II.2. PROSEDUR KERJA**

1. Uji buih
2. Filtat diambil sebanyak 4 ml, dimasukkan tabung reaksi, kemudian ditambah aquades 4 ml, di vortex selama kira – kira 30 detik.
3. Tes buih positif mengandung saponim bila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan 3 cm di atas permukaan cairan.
4. Reaksi Warna
5. Preparasi sampel:

Diambil filtrat sebanyak 10 ml, dilarutkan dalam etanol 10 ml, lalu dibagi menjadi tiga bagian masing – masing 5 ml, di sebut sebagai larutan IIA, IIB, dan IIC.

1. Uji Liebermann-Burchard
2. Larutan IIA di gunakan sebagai blanko, larutan IIB sebanyak 5 ml ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H2SO4 pekat, amati perubahan warna yang terjadi. Kemudian kocok perlahan dan diamati terjadinya perubahan warna.
3. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya saponin steroid, warna merah ungu menunjukkan adanya saponin triterpenoid dan warna kuning muda menunjukkan adanya saponin triterpenoid/ steroid jenuh. (**terjadi perubahan warna kuning kehijauan menunjukkan adanya saponin triterpenoid/ steroid jenuh**).
4. Uji salkowski
5. Larutan IIA digunakan sebagai blanko, larutan IIC sebanyak 5 ml ditambah 1 ml H2SO4 pekat melalui dinding tabung reaksi.
6. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cicin warna merah. (**tidak timbul cincin warna merah, dimungkinkan karena filtrat yang digunakan bukan berasal dari hasil ekstrak langsung**).
7. Kromatografi Lapis Tipis
8. Identifikasi sapogenin steroid/ triterpenoid
9. Ektrak sebanyak 0,5 gram di tambah 5 ml HCI 2N, didihkan dan tutup dengan corong berisi kapas basah selama 50 menit untuk menghidrolisis saponin.
10. Setelah dingin, tambahkan ammonia sampai basah kemudian ektraksi dengan 4-5 ml n-heksana sebanyak dua kali, lalu uapkan sampai tinggal 0,5 ml totolkan pada plat KLT.

Fase diam : kiesel Gel 254

Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4:1)

Penampak noda : - asam sulfat (dengan pemasaran)

1. Adanya sapogenin ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu (ungu) untuk anesaldehida asam sulfat. (poin C1 tidak dilakuakn)
2. Identifikasi terpenoid/steroid bebas secara KLT
3. Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes etanol, diaduk sampai larut, totolkan pada fase diam.
4. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:

Fase diam : kiesel Gel 254

Fase gerak : n-heksana-etil asetat (4:1) (8 ml :2 ml)

Penampak noda : Anisaldehida asam sulfat( dengan pemanasan) pemanasan menggunakan TLC heater

1. Adanya terpenoid/steroid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu. **Pada praktikum ini tidak tampak adanya warna merah atau ungu. Hal ini dikarenakan filtart yang digunakan bukan dari hasil ekstrak tetapi serbuk**

**TUGAS III**

**IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN FLAVONOIDA**

**( Ekstrak *Psidium guajava*)**

**III.1. TUJUAN**

Mahasiswa mampu melakukan identifikasi senyawa golongan flavonoida dalam tanaman.

**II.2. PROSEDUR KERJA**

1. Preparasi sampel
2. 0,3 gram ekstrak di kocok dengan 3 ml n-heksana berkali – kali dalam tabungreaksi sampai ekstrak h-heksana tidak berwarna.
3. Residu di larutkan dalam 20 mL etanol dan di bagi menjadi 4 bagian, masing – masing di sebut sebagai larutan IIIA, IIIB, IIIC, dan IIID.
4. Reaksi warna
5. Uji Bate-Smith dan Metcalf
6. Larutan IIIA sebagai blanko, larutan IIIB ditambah 0,5 ml HCI pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian panaskan di atas penangas air dan amati lagi perubahan warna yang terjadi.
7. Bila perlahan –lahanmenjadi warna merah terang atau unggu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin ( dibandingkan dengan blanko)
8. Uji Wilstater
9. Larutkan IIIA sebagai blanko, larutan IIIC di tambah 0,5 ml HCI pekat dan 4 potongan magnesium.
10. Diamati perubahan warna yang terjadi, di encerkan dengan 2ml air suling, kemudian di tambah 1 ml butanol.
11. Diamati warna yang terjadi di setiap lapisan, perubahan warna jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, merah tua menunjukkan adanya flavanon.
12. Kromatografi Lapis Tipis
13. Larutan IIID ditotolkan pada fase diam.
14. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:

Fase diam : lapisan tipis selulosa (di ganti Kiesel Gel 254)

Fase gerak : Kloroform:aseton:asam formiat(6:6:1)

Penampak noda : - Pereaksi sitrat borat atau

* Uap amonia atau
* Asam sulfat 10%

1. Adanya flavonoid di tunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif.
2. Noda kuning yang di timbulkan oleh uap ammonia akan hilang secara perlahan ketika amonianya menguap meninggalkan noda.
3. Sedangkan noda kuning yang ditimbulkan oleh pereaksi sitrat-borat sifatnya permanen.

**TUGAS IV**

**IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN POLIFENOL DAN TANIN**

**IV.1. TUJUAN**

Mahasiswa mampu melakukan identifikasi senyawa golongan polifenol dan tanin dalam tanaman.

**IV.2. PROSEDUR KERJA**

1. Preparasi sampel
2. 0,3 gram ekstrak ditambah 10 ml aquadest panas, diaduk dan di biarkan sampai temperatur kamar, lalu tambahkan 3-4 tetes 10% NaCI, diaduk dan di saring.
3. Filtrat di bagi menjadi tiga bagian masing – masing ± 3 ml dan disebut sebagai larutan IVA, IVB, dan IVC.
4. Uji gelatin
5. Larutan IVA di gunakan sbagai blanko, larutan IVB ditambah dengan sedikit larutan gelatin dan 5 ml larutan NaCI 10%.
6. Jika terjadi endapan putih menunjukkan adanya tanin.
7. Uji Ferri klorida
8. Sebagai larutan IVC diberi beberapa tetes larutan FeCI3 , kemudian diamati terjadinya perubahan warna.
9. Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.
10. Jika pada penambahan gelatin dan NaCI tidak endapan putih, tetapi setelah ditambah dengan larutan FeCI3 terjadi perubahan warna menjadi hijau biru hingga hitam, menunjukkan adanya senyawa polifenol.

FeCI3 positif, uji gelatin positif 🡪 tanin (+)

FeCI3 positif, uji gelatin negatif 🡪 polifenol (+)

FeCI3 negatif 🡪 polifenol (-), tannin (-)

1. Kromatografi Lapis Tipis
2. Sebagian larutan IVC di gunakan untuk pemeriksaan dengan KLT.

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : Kloroform-etil esetat-Asam formiat (0,5 : 9:0,5)

1. Jika timbul warna hitam menunjukkan adanya polifenol dalam sampel.

**TUGAS V**

**IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN ANTRAKINON**

**(Ektrak *Rheum officinale* L)**

**V.1. TUJUAN**

Mahasiswa mampu melakukan identifikasi senyawa golongan antrakinon dalam tanaman.

**V.2. PROSEDUR KERJA**

a. Reaksi warna

1. Uji borntrager

1) Ekstrak sebanyak 0,3 gram di ekstraksi dengan 10 ml aquadest,saring,lalu filtrat di ekstraksi dengan 5 ml toluena dalam corong pisah.

2) Ekstraksi dilakukan sebanyak 2 kali. Kemudian fase toluena dikumpulkan dan dibagi menjadi dua bagian,disebut sebagai larutan VA dan VB.

3) Larutan VA sebagai blanko,larutan VB ditambah amonia pekat 1 ml dan dikocok.

4) Timbulnya warna merah menunjukkan adanya senyawa antrakinon.

2. Uji modifikasi borntrager

1) Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditambah dengan 5 ml KOH 0,5 N dan 1 ml H2O2encer.

2) Dipanaskan selama 5 menit dan disaring,filtrat ditambah asam asetat glasial,kemudian di ekstraksi dengan 5 ml toluena.

3) Fase toluena diambil dan dibagi menjadi dua sebagai larutan VIA danVIB.

4) Larutan VIA sebagai blanko,larutan VIB ditambah amonia pekat 1 ml. Timbulnya warna merah atau merah muda pada lapisan alkalis menunjukkan adanya antrakinon.

b. Kromatografi Lapis Tipis

1. Sampel ditotolkan pada fase diam. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

Fase diam : Kiesel Gel 254

Fase gerak : toluena –etil asetat-asam asetat glasial (75-24-1)

Penampak noda : Larutan KOH 10%cdalam metanol.

1. Timbulnya noda berwarna kuning, kuning coklat, merah ungu atau hijau ungu menunjukkan adanya senyawa antrakinon.

**TUGAS VI**

**UJI KLT DENGAN BERBAGAI ELUEN**

**VI.1. TUJUAN**

Mahasiswa mampu menjelaskan tentang kaitan antara polaritas eluen dengan harga Rf.

**VI.2. PROSEDUR KERJA**

1. Larutkan sedikit kolesterol ke dalam kloroform.
2. Totolka pada 4 plat KLT (Kiesel Gel 254)
3. Siapkan 4 macam eluen (fase gerak) yaitu :

n-Heksan-Etil asetat (1:1)

n-Heksan-Etil asetat (4:1)

Kloroform-Metamol (4:1)

Koloform:Etil asetat (4:1)

1. Eluasi 4 plat KLT tersebut dengan eluen yang dibuat.
2. Semprot dengan penampak noda anisaldehid asam sulfat.
3. Panaskan 100 oC sampai timbul noda berwarna merah ungu/ ungu.
4. Hitung harga Rf pada masing-masing plat KLT.
5. Diskusikan,mengapa harga Rf pada masing-masing plat berbeda.

**TUGAS VII**

**FRAKSINASI DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

**VII.1. TUJUAN**

Mahasiswa mampu melakukan graksinasi suatu ekstrak menggunakan kromatografi kolom

**VII.2. PROSEDUR KERJA**

1. Lakukan optimasi eluen dengan cara uji KLT terhadap ekstrak dengan mengganti-ganti eluen sampai memperoleh pemuatan yang baik. Eluen tersebut akan di gunakan untuk fraksinasi.
2. Siapkan ± 50 gram silica gel
3. Siapkan eluen dari butir (1) sebanyak 300 ml
4. Silika gel di masukkan ke dalam labu erlenmeyer, kemudian ditambahkan sedikit eluen, kocok selama 15 menit
5. Campuran butir(4) tersebut di tuang ke dalam kolom sampai setinggi 10 cm dari atas.
6. Tuangkan eluen ke dalam kolom sampai penuh, tutup dengan aluminium foil, biarkan semalam.
7. Timbang ekstrak sebanyak 1% dari jumlah silica gel yang di gunakan, kemudian ekstrak di tambah kan sedikit pelarut (etanot/methanol) ad larut di campur dengan silica gel sama banyak, di aduk-aduk menggunakkan gelas pengaduk sampai homogen dan kering.
8. Eluen di alirkan sampai permukaannya 0,5 cm di atas permukaan silica gel
9. Ekstrak yang sudah di keringkan dengan silica gel, di masukkan ke dalam kolom ( di atas permukaan silica gel), lalu di tambah eluen kira-kira setinggi 3cm. Eluen dialirkan/diteteskan sambil di tuangi eluen baru sampai kolom terisi penuh dengan eluen, sementara penetesan tetap dilakukan, kecepatan penetesan diatur.
10. Penempungan eluen stiap vial sebanyak 5 ml
11. Dilakukan uji KLT untuk setiap kelipatan 10 vial ( vial no 1,10,20,30,40,dst), pada uji KLT, fase gerak yang di gunakan adalah sama dengan fase gerak pada kromatografi kolom.
12. Bila uji KLT memberikan noda yang sama, maka fraksi di antaranya dapat di gabung.
13. Bila uji KLT memberikan noda yang berbeda , maka uji KLT di lakukan pada vial di antaranya (bila vial no 10 dan 20 berbeda, maka vial no.15 di lakukan uji KLT).
14. Penetesan di hentikan bila vial terakhir sudah tidak memberikan noda pada uji KLT.