

PENUNTUN PRAKTIKUM

TEKNOLOGI PEMISAHAN



Disusun oleh :

Tim DPP Teknologi Pemisahan

UNIVERSITAS PANCASILA

FAKULTAS FARMASI

JAKARTA

2025

UNIVERSITAS PANCASILA

FAKULTAS FARMASI

JAKARTA



**PERSETUJUAN MATERI PRAKTIKUM
PRODI SARJANA**

Mata Praktikum	:	Teknologi Pemisahan
Semester	:	III (tiga)
Beban SKS	:	1 (satu)
Tahun akademik	:	2025/2026

Jakarta, 27 Agustus 2025

Mengetahui:

Disetujui oleh:

Kaprodi S1

Koordinator


Prof. Dr. apt. Esti Mumpuni, M.Si.


Dr. apt. Liliek Nurhidayati, M.Si.

KATA PENGANTAR

Buku penuntun Praktikum Teknologi Pemisahan ini disusun untuk keperluan Praktikum bagi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Pancasila semester III.

Penuntun ini mencakup metode ekstraksi, kromatografi lapis tipis, kromatografi kertas, kromatografi kolom dan kromatografi gas. Bahan baku simplisia yang digunakan pada tahun 2025 ini adalah bahan utama untuk praktikum. Ada kesinambungan hasil praktikum antar percobaan. Untuk lebih memahami materi praktikum tersebut, mahasiswa diharuskan mempelajari pustaka yang dicantumkan pada setiap judul percobaan.

Mudah-mudahan penuntun praktikum ini dapat membantu kelancaran praktikum dan saran perbaikan atas kekurangan dalam penuntun ini akan diterima dengan senang hati.

Jakarta, Agustus 2025

Penyusun

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR		iii
DAFTAR ISI		iv
Tata Tertib laboratorium		v
Percobaan 1	Ekstraksi Cair-Padat	1
Percobaan 2	Ekstraksi Cair-Cair	5
Percobaan 3	Kromatografi Lapis Tipis	8
Percobaan 4	Kromatografi Kertas	14
Percobaan 5	Kromatografi Kolom	16
Percobaan 6	Kromatografi Cair Vakum	19
Percobaan 7	KLT Preparatif & KKT Preparatif	21
Percobaan 8	Kromatografi Gas	22

TATA TERTIB LABORATORIUM

Selama mengikuti praktikum Teknologi Pemisahan, mahasiswa harus mematuhi tata tertib berikut ini:

1. Mahasiswa sudah berada di laboratorium minimal 10 menit sebelum praktikum dengan memakai jas lab, dan mengisi daftar hadir.
2. Memeriksa kelengkapan alat sebelum dan sesudah praktikum (diparaf staff lab/asisten)
3. Praktikum dibagi dalam kelompok tiap peserta harus berperan aktif
4. Sebagai persyaratan mengikuti praktikum setiap kelompok harus menyerahkan laporan resmi percobaan sebelumnya*. Laporan ditulis tangan dimasukkan ke dalam map. Laporan resmi ditandatangani si pembuat. Bila laporan tertinggal kelompok yang bersangkutan tidak boleh praktikum pada hari tersebut.
5. Sebelum ujian alat-alat di laci harus dikembalikan dengan lengkap (tanggung jawab kelompok pemakai)
6. Alat-alat di luar laci bila rusak/pecah/hilang ditanggung semua peserta praktikum dengan ketentuan tersendiri.
7. Perlengkapan kelompok yang belum diatur dalam tata tertib ini akan disampaikan kemudian dan ditempel di papan pengumuman di depan laboratorium.
8. Mahasiswa wajib mengikuti semua percobaan.

JADWAL PRAKTIKUM TEKNOLOGI PEMISAHAN
Semester Gasal 2025/2026

MG Ke-	Tanggal	Topik	Keterangan
I	8 - 12 Sept 2025	Pengantar Praktikum (sesuai hari)	Luring
II	16 – 19 Sept 2025	EKSTRAKSI CAIR PADAT	Praktek/luring
III	22 – 26 Sept 2025	EKSTRAKSI CAIR PADAT	Praktek/luring
IV	29 Sept - 2 Okt 2025	EKSTRAKSI CAIR-CAIR	Praktek/luring
V	6 – 10 Okt 2025	EKSTRAKSI CAIR-CAIR	Praktek/luring
VI	13 – 17 Okt 2025	KLT, KKt, Identifikasi Bahan Kimia Obat dalam Ramuan Jamu	Praktek/luring
VII	20 – 24 Okt 2025	KLT, KKt, Identifikasi Bahan Kimia Obat dalam Ramuan Jamu	Praktek/luring
VIII-IX	27 Okt – 7 Nov 2025	UTS (kuliah)	
VIII	10 – 14 Nov 2025	UTS praktikum	Luring
IX	17 – 21 Nov 2025	Kromatografi cair vakum (KCV); kromatografi kolom ; KLT preparatif, KKt preparatif	luring
X	24 – 28 Nov 2025	Kromatografi cair vakum (KCV); kromatografi kolom ; KLT preparatif, KKt preparatif	Praktek/luring
XI	1 – 5 Des 2025	Kromatografi gas	Praktek/luring
XII	8 Des – 12 Des 2025	Presentasi hasil praktikum	Praktek/luring
XIII	15 – 19 Des 2025	UAS praktikum	luring
XIV	22 – 24 Des 2025	Ujian perbaikan nilai	daring

Jakarta, 27 Agustus 2025

DPP Teknologi Pemisahan

PERCOBAAN 1

EKSTRAKSI CAIR PADAT

A. Tujuan percobaan:

Ekstraksi cair padat bertujuan melarutkan suatu komponen senyawa yang berada dalam keadaan fase padat.

B. Teori Singkat :

Salah satu metode yang digunakan untuk pengembangan obat tradisional adalah metode ekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu.

Prinsip ekstraksi yaitu melarutkan komponen senyawa yang berada dalam campuran/ bahan padat/ simplisia secara selektif dengan pelarut yang sesuai dengan cara yang cocok sehingga diperoleh hasil secara kualitatif dan kuantitatif memenuhi persyaratan.

Pada prinsipnya senyawa polar diekstraksi dengan pelarut polar, senyawa semipolar diekstraksi dengan pelarut semipolar, sedangkan senyawa non polar diekstraksi dengan menggunakan pelarut non polar.

Metode ekstraksi cair padat (ECP) ada 2 cara, yaitu cara panas dan cara dingin.

Cara panas antara lain:

1. Refluks

Ekstraksi dengan pelarut pada suhu didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Pada metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu.

2. Soxhlet

Ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi aliran kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux.

3. Digesti

Maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan yaitu 40-50 °C.

4. Infus

Ekstraksi dengan pelarut air pada penangas air, bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih (96-98 °C) selama 15-20 menit.

5. Dekok

Sama seperti infus tetapi waktu lebih lama $\pm$ 30 menit.

Cara dingin antara lain:

1. Maserasi / Maserasi pengadukan:

Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk bahan dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri

2. Perkolasi:

Ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai ekstraksi sempurna yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan.

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah.

Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan.

Metode lain:

Ultrasound - Assisted Solvent Extraction

Merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan ultrasound (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah ultrasonic dan ultrasound. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel dapat menyebabkan peningkatan kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi.

C. Bahan dan Alat :

1. Alat :

Gelas Piala volume 2 liter , alat pengaduk spindle, batang pengaduk, gelas ukur 100 ml, aluminium foil, cawan penguap, kapas, kertas saring, labu alas bulat, pendingin balik, rotavapor vakum

2. Bahan:

Serbuk simplisia daun saga, daun kumis kucing, daun jambu, daun sambiloto, daun afrika, etanol.

D. Cara kerja :

Pembuatan ekstrak :

1. Maserasi Pengadukan

Timbang sebanyak 200 gram serbuk simplisia, masukkan ke dalam maserator (bisa dimodifikasi menggunakan wadah yang tersedia), tambahkan pelarut etanol secukupnya secara perlahan sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen dan rata, kemudian tambahkan lagi pelarut hingga terdapat lapisan pelarut 2,5-3 cm tingginya dari permukaan serbuk simplisia, tutup permukaan wadah dengan plastik, pasang alat pengaduk spindel, lakukan pengadukan selama lebih kurang 1 jam pada suhu kamar. Saring dengan kapas dan setelah itu maserat disaring lagi dengan kertas saring. Ampas dimaserasi kembali selama 45 menit dan disaring. Ekstrak etanol yang diperoleh digabungkan dan dipekatkan dengan rotavapor vakum pada suhu lebih rendah dari titik didih pelarut (40-50°C) hingga diperoleh ekstrak kental.

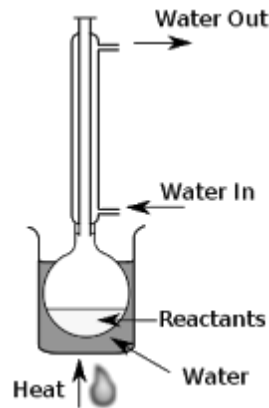
3. Digesti

Timbang sebanyak 200 gram serbuk simplisia, masukkan ke dalam gelas piala, tambahkan pelarut etanol secukupnya secara perlahan sambil diaduk dengan batang pengaduk sampai homogen dan rata, kemudian tambahkan lagi pelarut hingga terdapat lapisan pelarut 2,5-3 cm tingginya dari permukaan serbuk simplisia, tutup permukaan wadah dengan plastik, pasang alat pengaduk spindel, lakukan pengadukan selama lebih kurang 1 jam pada suhu 40 – 50°C. Saring dengan kapas dan setelah itu ekstrak saring lagi dengan kertas saring. Ampas didigesti kembali selama 45 menit dan disaring. Ekstrak etanol yang diperoleh digabungkan dan dipekatkan dengan rotavapor vakum pada suhu lebih rendah dari titik didih pelarut (40-50°C) hingga diperoleh ekstrak kental.

4. Refluks

Timbang sebanyak 200 gram serbuk simplisia, masukkan ke dalam labu alas bulat yang berisi batu didih, tambahkan pelarut etanol secukupnya secara perlahan sambil diaduk sampai homogen dan rata, tambahkan lagi pelarut hingga terdapat lapisan pelarut 3-5 cm tingginya dari permukaan serbuk simplisia. Hubungkan labu alas bulat dengan kondensor seperti tampak pada

gambar. Panaskan pada suhu didih pelarut selama 1-2 jam pada tangas air. Saring isi labu. Ampas direfluks lagi selama 30 menit dan disaring. Ekstrak yang diperoleh digabungkan dan dipekatkan dengan rotavapor vakum pada suhu lebih rendah dari titik didih pelarut (40-50°C) hingga diperoleh ekstrak kental.



Gambar 1.1. Susunan alat refluks

Pengertian dan istilah :

- Ekstraksi : ialah isolasi senyawa yang terdapat dalam campuran larutan atau campuran padat dengan menggunakan pelarut yang cocok /sesuai.
- Ekstraktan : pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi.
- Rafinat : larutan senyawa atau bahan yang akan diekstraksi.
- Linarut (solut) : senyawa atau zat yang diinginkan terlarut dalam rafinat.

Tugas : 1. Sebutkan keuntungan dan kerugian ekstraksi cara panas dan dingin.
 2. Sebutkan kriteria pemilihan pelarut
 3. Berapa titik didih pelarut etanol dan metanol.
 4. Jelaskan prinsip kerja alat rotavapor
 5. Jelaskan persamaan dan perbedaan ekstraksi secara maserasi dan refluks

Pustaka

Harborne JB. Metode Fitokimia : Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan, Terjemahan K. Padmawinata , Iwang S, Terbitan kedua. ITB , Bandung.

Mukhriani. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Journal Kesehatan*. 2014. Vol 7 (2). 361-367

PERCOBAAN 2

EKSTRAKSI CAIR CAIR

A. Tujuan :

Memisahkan suatu senyawa berdasarkan perbedaan kemampuan partisi pada pelarut berbeda tak campur dengan menggunakan tingkat kepolaran pelarut mulai dari pelarut non polar, semi polar dan pelarut polar.

B. Teori singkat :

Menurut hukum partisi dari Nernst :

Jika sistem pemisahan mencapai kesetimbangan maka nisbah (ratio) konsentrasi (aktivitas) setiap komponen (linarut) di dalam kedua fase tak campur menjadi tetap dan dapat dinyatakan sebagai tetapan kesetimbangan (koefisien distribusi/partisi). Besar koefisien distribusi adalah tetap pada suhu tetap bila tidak ada interaksi antara linarut dan pelarut.

Menurut kaidah distribusi/partisi :

$$K = \frac{C_A}{C_B}$$

C_A = konsentrasi solut dalam rafinat

C_B = konsentrasi solut dalam ekstraktan

K = koefisien partisi/distribusi pada t tetap

Setelah n kali ekstraksi :

$$W_n = W_o \left[\frac{KV}{KV + S} \right]^n$$

W_n = Bobot solut di dalam fraksi cair sesudah n kali ekstraksi

W_o = Bobot solut awal dalam rafinat

K = koefisien partisi

V = volume rafinat

S = volume ekstraktan

Dari rumus ini terlihat bahwa ekstraksi berulang-ulang dengan volume pelarut terbagi lebih baik daripada satu kali ekstraksi dengan total volume yang sama.

Untuk mencapai proses ekstraksi cair-cair yang baik, pelarut yang digunakan harus memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. kemampuan tinggi melarutkan komponen zat terlarut di dalam campuran.
2. kemampuan tinggi untuk diambil kembali.
3. perbedaan berat jenis antara ekstrak dan rafinat lebih besar.
4. pelarut dan larutan yang akan diekstraksi harus tidak mudah campur.
5. tidak mudah bereaksi dengan zat yang akan diekstraksi.
6. tidak merusak alat secara korosi.
7. tidak mudah terbakar, tidak beracun dan harganya relatif murah.

Masalah-masalah dalam ekstraksi pelarut

Beberapa masalah sering dijumpai ketika melakukan ekstraksi pelarut yaitu:

1. terbentuknya emulsi;
2. analit terikat kuat pada partikulat;
3. analit terserap oleh partikulat yang mungkin ada;
4. analit terikat pada senyawa yang mempunyai berat molekul tinggi; dan
5. adanya kelarutan analit secara bersama-sama dalam kedua fase.

Terjadinya emulsi merupakan hal yang paling sering dijumpai. Oleh karena itu jika emulsi antara kedua fase ini tidak dirusak maka recovery yang diperoleh kurang bagus. Emulsi dapat dipecah dengan beberapa cara :

1. Penambahan garam ke dalam fase air
2. Pemanasan atau pendinginan corong pisah yang digunakan
3. Penyaringan melalui glass-wool
4. Penyaringan dengan menggunakan kertas saring
5. Penambahan sedikit pelarut organik yang berbeda
6. Sentrifugasi.

C. Bahan dan Alat

1. Alat : - Corong pisah 500 ml, gelas piala 1 L
- Erlenmeyer bertutup 250 mL, 500 mL
2. Bahan : - ekstrak kental (dari percobaan 1)
- diklorometana
- *n*-heksana
- *n*-butanol
- aquades

D. Prosedur

1. Timbang minimal 8 g ekstrak kental etanol simplisia (dari percobaan 1) dan tambahkan aquadest sebanyak 100 mL sambil di aduk-aduk sampai homogen dan dituang ke dalam corong pisah.
2. Ditambahkan pelarut *n*-heksana sebanyak 30 mL, kocok (pengocokan 4 kali 30 mL), kumpulkan fase *n*-heksana lalu diuapkan dengan rotavapor vakum sehingga diperoleh ekstrak *n*-heksana kental (tempatkan dalam cawan penguap yang sudah ditara, disebut ekstrak non polar).
3. Lapisan air (sisa) diambil, ditempatkan dalam corong pisah lalu dikocok dengan diklorometana 4 kali 30 mL, kumpulkan fase diklorometana lalu diuapkan dengan rotavapor vakum sehingga diperoleh ekstrak kental diklorometana (tempatkan dalam cawan penguap, disebut ekstrak semi polar).
4. Lapisan air (sisa) diambil ditempatkan dalam corong pisah lalu dikocok dengan pelarut *n*-butanol 3 kali 20 mL, kumpulkan fase *n*-butanol dan diuapkan dengan rotavapor vakum sehingga diperoleh ekstrak *n*-butanol kental (tempatkan dalam cawan penguap, disebut ekstrak polar).

PERHATIAN: Setiap sisa pelarut hasil rotavapor **tidak dibuang** tapi dimasukkan dalam botol sisa rotavapor sesuai jenis pelarut!!!

Pertanyaan:

1. Sebutkan tingkat kepolaran, bobot jenis dan titik didih pelarut yang digunakan pada percobaan ini.
2. Jelaskan mengapa pada proses ECC dimulai dari pelarut yg non polar

Pustaka

Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Editor: Sukhdev Swami Handa, International Centre for Science and High Technologies, Trieste, 2008

Martunus&Helwani, Z. Ekstraksi Senyawa Aromatis dari Heavy GasOil (HGO) dengan Pelarut Trietilen Glikol (TEG). 2005 J. Si. Tek. 4[2]: 34-37.

PERCOBAAN 3

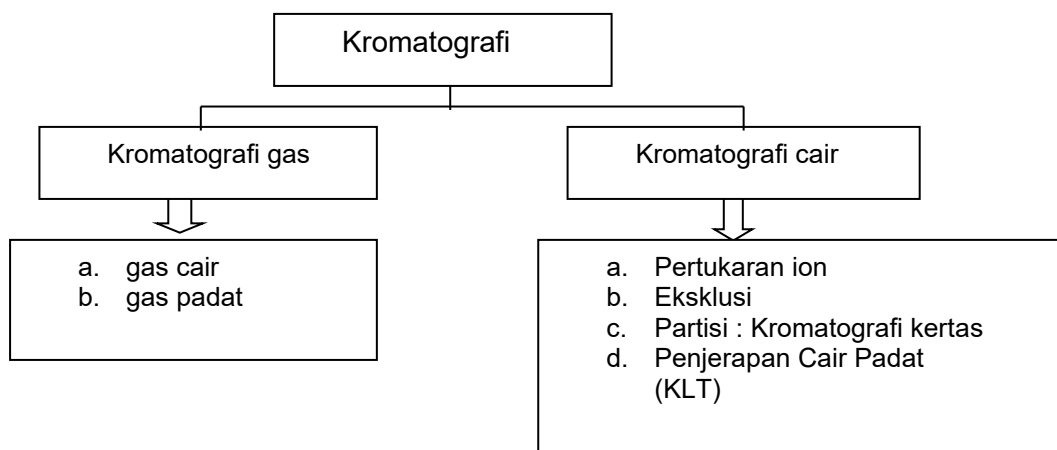
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

A. Tujuan percobaan:

1. Memahami prinsip pemisahan secara kromatografi lapis tipis
2. Memisahkan campuran senyawa secara kromatografi lapis tipis dan menghitung harga R_f .

B. Teori Singkat :

Kromatografi adalah metode pemisahan zat terlarut karena migrasi zat dalam sistem dua fase atau lebih, dan zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas akibat perbedaan kemampuan adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kerapatan muatan ion, kemudian masing-masing zat dapat diidentifikasi dan ditetapkan dengan metode analitik.



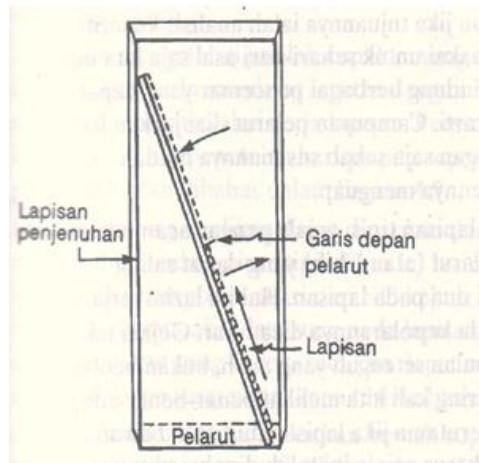
Kromatografi Lapis Tipis:

Metode ini didasarkan pada adsorpsi/ penjerapan zat pada fasa diam (padat) yang disaputkan pada pelat (kaca, logam). Zat yang akan dipisahkan, ditotolkan berupa bercak atau pita, kemudian pelat diletakkan dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang, selanjutnya akan terjadi perambatan zat akibat kapilaritas dan terjadilah pemisahan berbentuk noda atau spot.

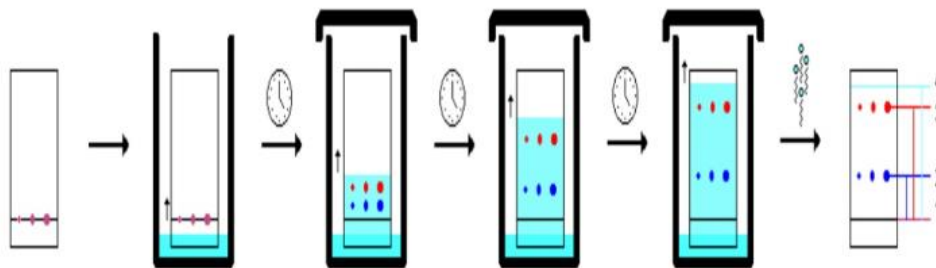
Fase diam berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai penjerap. Serbuk penjerap yang sering dipakai pada KLT di antaranya: silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), kieselgur (tanah diatomae) dan selulosa. Sedangkan fase gerak/pengembang adalah satu pelarut atau campuran pelarut. Pengembang ini akan bergerak pada fase diam yang berpori karena gaya kapilaritas. Zat yang akan dipisahkan dilarutkan terlebih dahulu dengan sedikit pelarut yang mudah menguap dengan kadar 5-10%.

Kromatografi lapis tipis dapat dipakai untuk tujuan :

1. mendapatkan hasil yang kuantitatif (kromatografi preparatif)
2. kualitatif / identifikasi (R_f noda dibandingkan dengan R_f senyawa pembanding, noda diidentifikasi dengan pereaksi spesifik)
3. menjajaki sistem pelarut yang akan dipakai dalam kromatografi kolom, KLT Preparatif, atau kromatografi cair kinerja tinggi.



Gambar 3.1. Lempeng KLT dalam *chamber*



Gambar 3.2. Langkah-langkah kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pilihan untuk pemisahan semua kandungan yang larut dalam lemak, seperti: lipid, steroid, karotenoid, kuinon sederhana dan klorofil. **Kelebihan** kromatografi lapis tipis adalah keserbagunaan, kecepatan dan kepekaannya, pemakaian pelarut dan cuplikan yang jumlahnya sedikit, kemungkinan penotolan berganda.

Deteksi noda yang tak berwarna adalah dengan

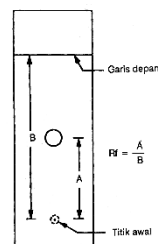
- lampu UV 254 dan 366 nm. Beberapa senyawa yang memiliki gugus kromofor akan berfluoresensi di bawah lampu tsb.
- pereaksi semprot kimia. Pereaksi kimia yang dapat menimbulkan warna dengan senyawa uji, menggunakan semprotan aerosol (membentuk tetesan halus).
- Deteksi biologi : untuk mendeteksi senyawa yang memiliki aktivitas fisiologi tertentu.

Penilaian kromatogram dalam bentuk angka Rf yaitu perbandingan antar jarak noda terhadap jarak pengembang.

$$R_f = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal (A)}}{\text{Jarak garis pengembang dari titik awal (B)}}$$

Harga Rf antara 0,00 – 1,00 (dua desimal)

$$hRf = Rf \times 100$$



Gambar 1.8 Kromatografi lapis tipis yang diidealkan menunjukkan bagaimana harga Rf diukur dan dihitung

Sistem pengembang harus disesuaikan dengan sifat zat uji hingga diperoleh noda yang bulat dan terpisah.

KLT dapat digunakan jika :

1. Senyawa tidak menguap atau tingkat penguapannya rendah.
2. Senyawa bersifat polar, semi polar, non polar, atau ionik.
3. Sampel dalam jumlah banyak harus dianalisis secara simultan, hemat biaya, dan dalam jangka waktu tertentu.
4. Sampel yang akan dianalisis akan merusak kolom pada Kromatografi Cair (KC) maupun Kromatografi Gas (KG).
5. Pelarut yang digunakan akan mengganggu penjerap dalam kolom Kromatografi Cair.
6. Senyawa dalam sampel yang akan dianalisis tidak dapat dideteksi dengan metode KC ataupun KG atau memiliki tingkat kesulitan yang tinggi.
7. Setelah proses kromatografi, semua komponen dalam sampel perlu dideteksi (berkaitan dengan nilai Rf).
8. Komponen dari suatu campuran dari suatu senyawa akan dideteksi terpisah setelah pemisahan atau akan dideteksi dengan berbagai metode secara bergantian (misalnya pada *drug screening*).

C. Bahan dan Alat

Alat:

Bejana pengembangan/ chamber

Pipa kapiler

Cawan uap

Bahan:

Ekstrak hasil percobaan 2

Etanol

n heksan

Diklorometana

Plat KLT Silika gel GF254 ukuran 4 x10 cm

D. Cara Kerja :

1. Buat larutan pengembang sesuai pustaka sebanyak 10 mL.
2. Masukkan larutan pengembang ke dalam chamber hingga setinggi 0,5-0,8 cm dan tutup rapat, biarkan terjadi proses penjenhuan selama $\pm$ 15 menit. (Untuk membantu mempercepat penjenhuan dapat dipasang kertas saring di salah satu sisi atau sekeliling dinding chamber hingga seluruh kertas saring basah)
3. Larutkan sedikit ekstrak dengan 3 mL etanol
4. Buat larutan pembanding 0,25 % dalam etanol 96%.
5. Pada plat KLT, buat garis awal dan garis akhir 1,5 cm dari tepi bawah dan 0,5 cm dari atas plat menggunakan pensil dengan hati-hati (jangan sampai tergores)
6. Totolkan ekstrak dan pembanding masing-masing pada garis awal sebanyak 5 μ l dan biarkan mengering
7. Dengan hati-hati, masukkan plat ke dalam chamber, dan tutup kembali dengan cepat
8. Biarkan hingga pengembang naik sampai garis akhir
9. Angkat plat dan keringkan.
10. Amati noda secara visual dan dibawah lampu UV 254 & 366, tandai dengan pensil, Jika perlu semprot dengan pereaksi kimia
11. hitung Rf setiap noda, dan gambarkan kromatogram pada setiap tampilan (visual, lampu uv 254, dan lampu uv 366)

Tugas :

- Kelompok 1 KLT fraksi non polar, pengembang heksan-diklorometana (3:2)
- Kelompok 2 KLT fraksi semi polar, n-heksan-diklorometana (2:3)
- Kelompok 3 Kertas fraksi polar (BAA → butanol-asam asetat-air = 4:1:5, diambil fase butanolnya)
- Kelompok 4 KLT : Identifikasi bahan kimia obat dalam ramuan jamu

Pertanyaan :

1. Apa saja hal yang mempengaruhi pemisahan secara KLT
2. Bagaimana cara menentukan R_f noda

IDENTIFIKASI BAHAN KIMIA OBAT DALAM RAMUAN JAMU

A. Tujuan percobaan :

Identifikasi kandungan kaptopril dalam ramuan jamu

B. Teori Singkat

Jamu adalah obat tradisional yang diracik dengan menggunakan bahan tanaman sebagai penyusun jamu tersebut. Jamu disajikan secara tradisional dalam bentuk serbuk seduhan, pil, serbuk, atau cairan. Jamu yang telah digunakan secara turun menurun selama berpuluh-puluh tahun bahkan mungkin ratusan tahun. Jamu harus memenuhi kriteria yaitu, aman sesuai dengan persyaratan yang sudah ditetapkan, klaim berkhasiat harus dapat dibuktikan berdasarkan data empiris, serta memenuhi persyaratan mutu yang berlaku (Peraturan Badan POM tahun 2024)

Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 007 tahun 2012 tentang Registrasi Obat Tradisional menyebutkan bahwa industri obat tradisional dilarang menghasilkan obat tradisional yang mengandung :

1. Etil alkohol yang melebihi 1% kecuali dalam bentuk sediaan tingtur dimana pemakaiannya dengan cara pengenceran
 2. Bahan kimia obat dari hasil isolasi atau sintetik berkhasiat obat
 3. Narkotika maupun psikotropika
 4. Bahan lain yang sesuai pertimbangan kesehatan dan berdasarkan penelitian bisa menyebabkan bahaya bagi kesehatan
- Bahan Kimia Obat (BKO) merupakan istilah yang biasa dipakai oleh dunia kefarmasian Indonesia untuk zat-zat obat konvensional/sintesis yang dicampurkan ke dalam obat herbal.

Berikut beberapa jenis obat herbal yang umumnya dicampuri BKO

Klaim kegunaan Obat tradisional

Pegal linu / encok / rematik

Pelangsing

Peningkat stamina / obat kuat pria

Kencing manis / diabetes

Sesak nafas / asma

Antihipertensi

BKO yang sering ditambahkan

Fenilbutason, antalgin, diklofenak sodium, piroksikam, parasetamol, prednison, atau deksametason

Sibutramin hidroklorida

Sildenafil Sitrat

Glibenklamid

Teofilin

Kaptopril

Untuk mengidentifikasi kaptopril dan turunannya bisa dilakukan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi.

Salah satu cara sederhana untuk identifikasi bahan kimia obat adalah kromatografi lapis tipis.

C. Bahan dan Alat

1. Alat:

- Lempeng silika gel GF 254 ukuran 4X10 cm
- Chamber
- Alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis

2. Bahan:

- Kaptopril
- Serbuk simplisia herba seledri dan simplisia daun kumis kucing
- Jamu dengan komposisi campuran simplisia herba seledri dan daun kumis kucing

Cara kerja:

1. Buat larutan

a. Pembanding

1) Kaptopril

Sejumlah lebih kurang 25 mg kaptopril ditambahkan etanol 96% sampai volumenya 5 mL

2) Ekstrak etanol 96% herba seledri dan daun kumis kucing

Lebih kurang 1 g masing-masing simplisia dimaserasi dengan 10 mL etanol 96%

b. Larutan uji:

Lebih kurang 1 g serbuk jamu dimaserasi dengan 10 mL etanol 96%, disaring.

2. Lakukan KLT terhadap empat larutan tersebut di atas

a. Volume penotolan 10 μ l, tandai dg pensil

b. Fase diam = silika gel GF 254 ukuran 6 X10 cm

c. Fase gerak = kloroform-metanol (90:10) atau

n-heksana-kloroform-etanol 96% (30:40:30)

d. Jarak rambat = 8 cm

e. Deteksi = UV 254 nm

3. Gambarkan kromatogram pada setiap tampilan (visual dan lampu UV 254)

4. Simpulkan apakah serbuk jamu yang diperiksa mengandung kaptopril atau tidak

E. Pustaka:

1. Mawarni Tobing. Validasi metode Identifikasi kaptopril, enalapril dan lisinopril dalam jamu tekanan darah tinggi secara kromatografi cair kinerja tinggi. Universitas Pancasila (skripsi), 2024

2. Gritter, Roy, Pengantar Kromatografi, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung, 1995
3. Mukhriani. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Journal Kesehatan*. 2014. Vol 7 (2). 361-367
4. Depkes RI. 2012. *Permenkes No. 007 Tahun 2012 Tentang Registrasi Obat Tradisional*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Jakarta.

PERCOBAAN 4

KROMATOGRAFI KERTAS

A. Tujuan percobaan:

Memisahkan senyawa polar secara kromatografi kertas dan menghitung harga R_f

B. Teori dasar:

Seperti pada KLT, tapi penjerap yang digunakan adalah kertas Whatman. Senyawa akan terpisah akibat adanya perbedaan kemampuan partisi zat pada air (fasa diam cair yang berada pada serabut kertas) dan pengembang. KKT ini cocok untuk memisahkan senyawa yang cenderung bersifat polar seperti: glikosida flavonoid, as amino, nukleotida dsb.

Kromatografi kertas jika dibandingkan dengan kromatografi lapis tipis memiliki beberapa kelebihan antara lain: tidak memerlukan plat pendukung, kertas dapat diperoleh dengan mudah dalam bentuk murni, panjang serabut pada kertas lebih panjang sehingga lebih banyak terjadi difusi kesamping dan bercak lebih besar. Disamping itu, lapisan selulosa lebih rapat dan pelarut cenderung mengalir lebih cepat dan menghasilkan pemisahan lebih tajam

C. Alat dan Bahan

Alat:

Bejana pengembangan/ chamber
Pipa kapiler
Cawan uap
Benang kasur & isolasi

Bahan:

Ekstrak butanol
Metanol
Aquadest
Asam asetat
Kertas Whatman 1 ukuran 15x4 cm

D. Cara Kerja

1. Buat larutan pengembang yaitu butanol-asam asetat-air (4:1:5) sebanyak 100 mL, ambil fase organik.
2. Masukkan larutan pengembang ke dalam chamber dengan ketinggian <1 cm dan tutup rapat, biarkan terjadi proses penjuanan selama $\pm$ 15 menit.
3. Larutkan sedikit ekstrak dengan 3 mL metanol
4. Pada kertas Whatman, buat garis awal 1 cm dari tepi bawah dan 6 cm dari tepi atas kertas menggunakan pensil (perhatikan arah serat).
5. Totolkan ekstrak 10 μ L pada garis awal dan biarkan mengering
6. Dengan hati-hati, gantungkan kertas di dalam chamber, tutup kembali dengan cepat
7. Biarkan hingga pengembang naik sampai garis akhir
8. Angkat kertas dan keringkan.
9. Amati noda secara visual dan dibawah lampu UV 254 & 366, dan tandai dengan pensil
10. Hitung R_f setiap noda yang terjadi.

11. Gambarkan kromatogram pada setiap tampilan.

E. Pustaka:

1. Johnson, Edward, Dasar Kromatografi Cair, Penerbit ITB, Bandung, 1991
2. Gritter, Roy, Pengantar Kromatografi, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung, 1991

PERCOBAAN 5

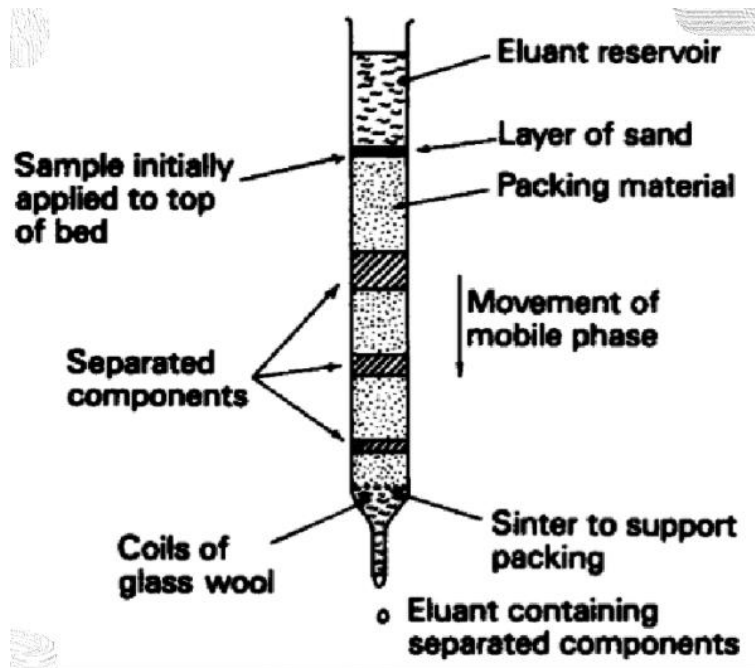
KROMATOGRAFI KOLOM

A. Tujuan percobaan:

Memisahkan zat menggunakan kromatografi kolom dan mendapatkan fraksi- fraksi

B. Teori Dasar:

Kolom berupa tabung kaca yang dilengkapi dengan kran pada salah satu ujungnya, dan ukuran diameter : panjang kolom= 1:10 - 1:30. Kemasan kolom harus dipilih dari jenis yang dipasarkan khusus untuk kromatografi kolom, karena ukuran partikel sangat mempengaruhi, jika partikel terlalu kecil maka laju aliran pengelusi akan lambat dan jika partikel terlalu besar maka pemisahan komponen secara kromatografi kurang baik. Perbandingan jumlah sampel dan penjerap umumnya 30 mg/gram penjerap.



Pelarut atau fase gerak dibiarkan mengalir melalui kolom, aliran tersebut disebabkan oleh gaya berat, dan zat akan terpisah membentuk pita-pita, dipisahkan dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari kolom.

.Ada beberapa cara untuk membuat kolom, di antaranya adalah :

a. Cara kering

Selapis pasir diletakkan ke dalam kolom, penjerap dituangkan ke dalam tabung sedikit demi sedikit. setelah semua penjerap dimasukkan, di atasnya diletakkan kertas saring dan

ditambah lagi selapis pasir sehingga jika ditambahkan pelarut permukaan penjerap tidak terganggu. Kemudian pelarut pengelusi dibiarkan mengalir ke bawah melauai penjerap dengan kolom terbuka sampai permukaan pelarut tepat sedikit di atas bagian atas kolom.

b. Cara basah

Selapisan pasir dimasukkan ke dalam kolom dan tabung diisi sepertiganya dengan pelarut. Pelarut yang dipakai pada proses pengemasan mungkin sama dengan pelarut yang akan dipakai untuk kromatografi atau pelarut yang kepolarannya lebih rendah. Penjerap dibuat lumpuran dengan bagian lain dari pelarut dan lumpuran ini dituangkan ke dalam pelarut di dalam tabung. Lumpuran dapat dimasukkan bagian demi bagian atau sekaligus. Keran dapat dibuka atau ditutup selama penambahan asal permukaan pelarut tetap di atas permukaan penjerap.

c. Kolom kemas-basah

Kolom kemas-basah dapat dibuat dengan mengisi tabung setengahnya dengan pelarut, lalu penjerap kering dimasukkan ke dalamnya berupa aliran halus melalui corong kecil. Penjerap dibiarkan mengendap, jika penjerap dimasukkan seluruhnya sekaligus biasanya diperoleh kolom yang sangat baik. Sepotong kertas saring diletakkan di atas penjerap serta ditambahkan selapisan pasir yang telah dicuci untuk menutupi kertas saring.

C. Alat dan bahan:

Alat :
Kolom kaca
Corong
Batang pengaduk
Kapas

Bahan :
Silika gel 60
n-heksan
diklorometana
ekstrak hasil percobaan sebelumnya

D. Cara Kerja

1. Masukkan kapas ke dalam kolom dan tabung diisi sepertiganya dengan pengembang (disesuaikan dengan hasil dari KLT)
2. Pelarut yang dipakai pada proses pembuatan kolom sama dengan pelarut yang akan dipakai untuk kromatografi atau pelarut yang kepolarannya lebih rendah.
3. Penjerap dibuat lumpuran dengan pelarut dan lumpuran ini dituangkan ke dalam pelarut di dalam tabung. Lumpuran dapat dimasukkan bagian demi bagian atau sekaligus. Keran dapat dibuka atau ditutup selama penambahan asal permukaan pelarut tetap di atas permukaan penjerap, letakkan kertas saring seukuran diameter kolom.

4. Larutkan ekstrak 3 gram dengan sedikit heksan, tuangkan dengan hati-hati ke dalam kolom, kira-kira ketebalan 1 cm
5. Elusi dengan pengembang secara perlahan, setelah terbentuk pita-pita, tampung setiap pita tersebut dalam vial kecil. Jaga jangan sampai pengembang kering.
6. Setiap fraksi di totolkan pada KLT atau KKt untuk melihat pemisahannya dan identifikasi.

E. Pustaka

1. Johnson, Edward, Dasar Kromatografi Cair, Penerbit ITB, Bandung, 1991
2. Gritter, Roy, Pengantar Kromatografi, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung, 1991
3. Farmakope Herbal Indonesia 2017
4. Hostettmann K., Cara Kromatografi Preparatif, ITB, Bandung, 1995

PERCOBAAN 6

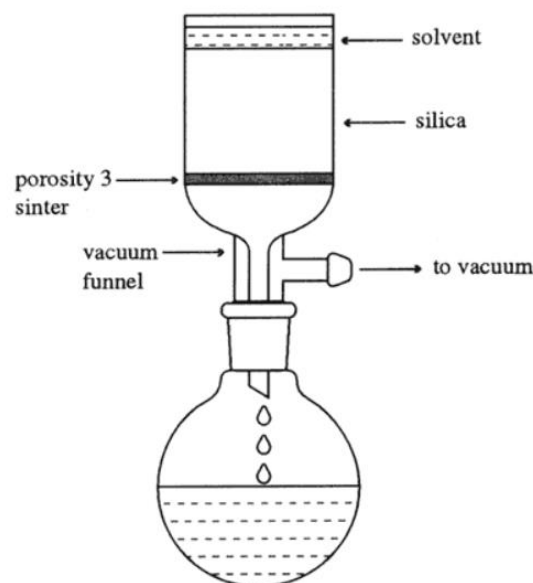
KROMATOGRAFI CAIR VAKUM

A. Tujuan percobaan:

Memisahkan senyawa menjadi fraksi-fraksi dengan kromatografi cair vakum (KCV)

B. Teori Dasar:

Kromatografi cair vakum merupakan kromatografi kolom yang dikemas kering biasanya dengan penjerap mutu kromatografi lapis tipis ($10\text{-}4\ \mu\text{m}$) dalam keadaan vakum. Setelah diperoleh kemasan yang maksimum, kemudian vakum dihentikan dan pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke dalam permukaan penjerap lalu divakum lagi, kolom dihisap sampai kering dan kolom sekarang siap untuk dipakai. Cuplikan yang akan dipisahkan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian dimasukkan langsung kedalam bagian atas kolom, kemudian dihisap perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Pada kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak.



C. Alat dan Bahan

Alat

Kolom KCV

Pompa vakum

Gelas ukur

Bahan:

Ekstrak (hasil percobaan 2)

n- heksan

Diklorometana

Statif dan cincin

Metanol

Kertas saring

Silika gel H 60

Cara Kerja

1. Pasang alat KCV dan pompa
2. Masukkan silika gel 60 dan ratakan dalam kolom, nyalakan pompa (vakum)
3. Ekstrak dikeringkan dengan silika gel dan ratakan diatas kolom, letakkan kertas saring seukuran diameter kolom, nyalakan pompa
4. Buat sederet larutan pengembang sebanyak @ 100 mL dengan kepolaran meningkat secara bertahap sbb:

No. fraksi	Heksan	Diklorometana	metanol
1	100	0	0
2	80	20	0
3	60	40	0
4	40	60	0
5	20	80	0
6	0	100	0
7	0	80	20
8	0	60	40
9	0	40	60
10	0	20	80
11	0	0	100

5. Masukkan pengembang fraksi 1 dengan hati-hati ke dalam kolom, nyalakan pompa hingga semua pengembang turun, keluarkan fraksi 1.
6. Masukkan pengembang fraksi 2 dst satu persatu, hingga fraksi terakhir
7. Pekatkan setiap fraksi dan pantau melalui KLT atau KKT.

D. Pustaka

1. Johnson, Edward, Dasar Kromatografi Cair, Penerbit ITB, Bandung, 1991
2. Gritter, Roy, Pengantar Kromatografi, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung, 1991

PERCOBAAN 7

KLT PREPARATIF & KKT PREPARATIF

A. Tujuan Percobaan:

Mendapatkan fraksi yang lebih murni secara KLT dan Kkt preparatif

B. Teori Dasar :

Dalam tahap pemisahan dan pemurnian senyawa, diperlukan berbagai metode preparatif untuk mendapatkan fraksi yang diinginkan. Bila sampel berukuran besar, dapat digunakan kromatografi kolom atau KCV, tetapi bila sampel sedikit (50 mg-1 g) maka metode yang dapat digunakan adalah KLT preparatif dan Kkt preparatif, terutama bila kita telah mengetahui kondisi pemisahan yang baik melalui KLT dan Kkt biasa.

Pada KLT Preparatif digunakan fasa diam yang lebih tebal sekitar 0,5mm -1,5 mm. Untuk Kkt Preparatif digunakan kertas yang lebih tebal yaitu Whatman 3. Sampel ditotolkan berbentuk garis di garis awal, sehingga pemisahan yg dihasilkan berbentuk pita-pita. Ukuran fasa diam biasanya 20x20 cm.

C. Alat dan Bahan

Alat :

Chamber kaca 20x20 cm

Oven

Pipa kapiler

Bahan :

Fraksi percobaan sebelumnya

Pelarut pengembang yang sesuai

Plat KLT preparatif

Kertas Whatman

D. Cara Kerja:

1. Siapkan larutan pengembang sesuai hasil KLT dan Kkt, masukkan ke dalam chamber dan tutup (Penjenuhan chamber ± 30 menit)
2. Siapkan plat KLT preparatif atau kertas Whatman3, beri garis awal ± 1 cm.
3. Totolkan ekstrak dan pembeding yang telah dilarutkan dalam sedikit pelarut hingga berbentuk garis.
4. Keringkan, masukkan dalam chamber dengan hati-hati
5. Tunggu hingga pengembangan mencapai garis atas
6. Angkat dan keringkan.
7. Tandai pita yang terbentuk
8. Untuk KLT Preparatif, kerok pita, maserasi dalam pelarut yang cocok, saring
9. Untuk Kkt Preparatif, gunting pita yang terbentuk, potong-potong dan maserasi dalam pelarut yang cocok., saring.

E. Pustaka

1. Gritter, Roy, Pengantar Kromatografi, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung, 1991
2. Hostettmann K., Cara Kromatografi Preparatif, ITB, Bandung, 1995

PERCOBAAN 8 KROMATOGRAFI GAS

A. Tujuan percobaan :

Identifikasi EG DEG sebagai cemaran dalam sediaan sirup secara GC-MS

B. Teori singkat:

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasarkan pada perbedaan migrasi/distribusi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam di bawah pengaruh pergerakan fase yang bergerak (fase gerak).

Pada kromatografi gas, sampel diuapkan dan diinjeksikan ke dalam kolom. Elusi berjalan karena aliran gas inert sebagai fase geraknya. Fase gerak tidak berinteraksi dengan molekul dari analit, hanya berfungsi sebagai pembawa analit ke dalam kolom.

Kromatografi gas merupakan metode dengan resolusi tinggi yang dapat mengidentifikasi serta menetapkan secara kuantitatif bahan dalam jumlah yang sangat kecil. Fase gerak kromatografi gas berupa gas dan fase diamnya umumnya berupa cairan, tetapi dapat berupa zat padat atau kombinasi zat padat dan cair.

Ada dua macam kromatografi gas, yaitu:

- Kromatografi gas-cair

Fase diam cair adalah zat cair sebagai lapisan tipis yang tetap pada penyangga padat inert, fase gerak berupa gas inert

- Kromatografi gas-padat

Fase diam adalah butiran-butiran adsorben padat. Fase gerak berupa gas.

Kromatografi gas dapat dipakai untuk setiap campuran yang sebagian atau semua komponennya memiliki tekanan uap yang cukup pada suhu yang dipakai untuk pemisahan. Tekanan uap atau keatsirian memungkinkan komponen menguap dan bergerak bersama-sama dengan fase gerak yang berupa gas. Senyawa yang tidak mudah menguap sering dapat diubah menjadi turunan yang lebih atsiri dan lebih stabil sebelum kromatografi.

Waktu yang dibutuhkan pada metode ini beragam, mulai dari beberapa detik untuk campuran sederhana sampai berjam-jam untuk campuran yang lebih kompleks. Komponen campuran dapat diidentifikasi dengan menggunakan waktu retensi atau waktuambat yang khas pada kondisi yang tepat sedangkan luas puncaknya sebanding dengan kadar zat.

Pada kromatografi terdapat empat variable utama yakni gas pembawa, jenis detektor, jenis kolom dan fase diam serta suhu untuk pemisahan.

Teknik kromatografi gas mempunyai beberapa keuntungan daripada kromatografi lain, yaitu: cepat, mudah dijalankan, sensitif, spesifik, resolusi atau pemisahan yang dihasilkan lebih

sempurna dan dapat digunakan untuk analisa kualitatif pada waktu retensi dan kuantitatif pada luas puncak.

Resolusi adalah ukuran keefisienan kolom dan pelarut (fase diam). Resolusi dapat menerangkan sempitnya puncak dan juga pemisahan antara 2 maksimum puncak. Harga resolusi dapat dihitung dengan rumus :

$$R = \frac{2d}{W1 + W2}$$

Dimana : R = Resolusi

d = Jarak antara 2 puncak

W1 = Lebar dasar puncak zat 1

W2 = Lebar dasar puncak zat 2

C. Bahan dan Alat

1. Bahan:

Sirop yang beredar di pasaran (misal sirop paracetamol)

Baku pembanding Etilen Glikol dan Dietilen glikol

2. Alat

Kromatograf gas-spektrometri massa Agilent GCMS 5977

Detektor Spektrometer Massa

D. Cara Kerja

1. Injeksikan baku pembanding yang tersedia dan sampel
2. Bandingkan waktu retensi BP dengan sampel
3. Hitung resolusi antara analit dengan puncak kromatogram di sebelahnya.

PUSTAKA

1. Instruction Manual GC-MS Agilent GCMS 5977
2. Skoog, Holler, Crouch. Principles of Instrumental Analysis. 6th ed. Thomson Belmont: Brooks/Cole. 2007
3. Elsa Lundanes, Leon Reubsaet and Tyge Greibrokk. Chromatography Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods. Wiley-VCH. Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, 2014