

PANDUAN PRAKTIKUM FITOKIMIA



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

1. UJI KUALITATIF FITOKIMIA

A. Pendahuluan

Tumbuhan memiliki senyawa aktif yang bersifat fungsional bagi tubuh. Beberapa tumbuhan pun memiliki komponen bioaktif yang sifatnya menonjol sehingga seringkali dimanfaatkan, terutama dalam bidang kesehatan. Harborne *et al.* (2006) menyatakan bahwa maraknya pemanfaatan senyawa fitokimia tumbuhan ini didorong oleh munculnya penelitian-penelitian mengenai pemanfaatan senyawa fitokimia yang mulai menggeser penggunaan bahan-bahan kimia.

Sebagian besar tumbuhan memiliki senyawa fitokimia dalam kadar yang berbeda-beda. Sebelum menganalisa kadar senyawa fitokimia secara lebih lanjut, terlebih dahulu dilakukan uji fitokimia secara kualitatif (Gajlakshmi *et al.*, 2012). Tujuannya adalah untuk memastikan ada tidaknya kandungan senyawa fitokimia pada suatu sampel uji. Analisa kualitatif ini penting untuk dilakukan agar tidak terjadi kesalahan identifikasi akibat kesamaan sifat komponen lain yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji kualitatif fitokimia terhadap sampel untuk mengetahui komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya.

B. Tujuan

Tujuan praktikum adalah untuk mengetahui ada tidaknya komponen bioaktif pada sampel uji.

C. Bahan Dan Alat

Alat yang digunakan dalam praktikum uji kualitatif fitokimia, antara lain: 1) gelas Beaker, 2) gelas ukur, 3) pipet tetes, 4) pipet volume, 5) spatula, 6) tabung reaksi, dan 7) timbangan analitik

Bahan yang digunakan dalam praktikum uji kualitatif fitokimia, antara lain: 1) alkohol, 2) amil alkohol, 3) anhidra asetat, 4) daun pandan, 5) daun pepaya, 6) daun singkong, 7) HCL 2N, 8) H₂SO₄, 9) kloroform, 10) pereaksi Meyer, dan 11) pereaksi Wagner

D. Cara Kerja

Bahan yang digunakan pada praktikum ini adalah daun singkong, daun pandan, daun pepaya, daun sirsak, daun kapuk, daun salam.

Persiapan Sample

1. Sample daun segar yang telah di peroleh dikering-anginkan untuk menurunkan kandungan airnya
2. Sample daun yang sudah kering tersebut di potong-potong menggunakan gunting
3. Kemudian potongan daun tersebut dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk
4. Serbuk daun yang diperoleh siap dianalisa

Praktikum uji kualitatif fitokimia terdiri atas 5 percobaan, yaitu uji alkaloid, uji steroid atau triterpenoid, uji flavonoid, uji saponin, dan uji fenol hidrokuinon. Cara kerja uji alkaloid adalah :

1. Sampel disimpan hingga kering dengan perlakuan penyimpanan suhu ruang dalam keadaan gelap, penyimpanan suhu ruang dalam keadaan terang, serta penyimpanan suhu dingin.
2. Sebanyak 0,5g sampel dari masing-masing perlakuan dilarutkan ke dalam asam sulfat 2N.
3. Sampel yang telah dilarutkan kemudian diberi pereaksi Meyer dan pereaksi Wagner.
4. Ada tidaknya endapan berwarna diamati.

Cara kerja uji steroid atau triterpenoid adalah :

1. Sampel disimpan hingga kering dengan perlakuan penyimpanan suhu ruang dalam keadaan gelap, penyimpanan suhu ruang dalam keadaan terang, serta penyimpanan suhu dingin.
2. Sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan ke dalam 2 ml kloroform.
3. Sampel yang telah dilarutkan kemudian diberi 10 tetes anhidrida asetat dan 3 tetes asam sulfat pekat. Perubahan warna diamati.

Cara kerja uji flavonoid adalah :

1. Sampel disimpan hingga kering dengan perlakuan penyimpanan suhu ruang dalam keadaan gelap, penyimpanan suhu ruang dalam keadaan terang, serta penyimpanan suhu dingin.
2. Sebanyak 0,5 g sampel dari masing-masing perlakuan diberi serbuk magnesium sebanyak 0,1 mg.
3. Sebanyak 0,4 mL amil alkohol dan 4 mL alkohol dicampurkan ke dalam sampel yang telah diberi serbuk magnesium.
4. Perubahan warna diamati.

Cara kerja uji saponin adalah :

1. Sampel disimpan hingga kering dengan perlakuan penyimpanan suhu ruang dalam keadaan gelap, penyimpanan suhu ruang dalam keadaan terang, serta penyimpanan suhu dingin.
2. Sampel sebanyak 0,5 g dari masing-masing perlakuan dilarutkan dengan asam klorida 2N.
3. Larutan sampel kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 30 menit.
4. Ada tidaknya busa diamati.

Cara kerja uji fenol hidrokuinon adalah :

1. Sampel disimpan hingga kering dengan perlakuan penyimpanan suhu ruang dalam keadaan gelap, penyimpanan suhu ruang dalam keadaan terang, serta penyimpanan suhu dingin.
2. Sampel sebanyak 0,5 g dari masing-masing perlakuan diekstrak dengan 10 mL etanol 70% dan didiamkan selama 30 menit.
3. Sebanyak 1 mL hasil ekstraksi diambil dan diberi 2 tetes FeCl_3 5%.
4. Perubahan warna diamati.

E. Hasil Dan Pembahasan

No.	Uji Fitokimia	Bahan	Standar	Keterangan
1.	Alkaloid			
	a. Mayer	1. Daun Singkong a. Gelap b. Ruang c. Dingin 2. Daun Pandan a. Gelap b. Ruang c. Dingin 3. Daun Pepaya a. Gelap b. Ruang c. Dingin	Endapan putih kekuningan	
	b. Wagner	1. Daun Singkong a. Gelap b. Ruang c. Dingin 2. Daun Pandan a. Gelap b. Ruang c. Dingin 3. Daun Pepaya a. Gelap b. Ruang c. Dingin	Endapan coklat	
2.	Flavonoid	1. Daun Singkong a. Gelap b. Ruang c. Dingin 2. Daun Pandan a. Gelap b. Ruang c. Dingin 3. Daun Pepaya a. Gelap b. Ruang c. Dingin	Lapisan amil alkohol berwarna merah/ hijau kuning/ hijau	
3.	Saponin	1. Daun Singkong a. Gelap b. Ruang c. Dingin 2. Daun Pandan a. Gelap b. Ruang	Terbentuk busa	

		<ul style="list-style-type: none"> c. Dingin 	
		<ul style="list-style-type: none"> 3. Daun Pepaya <ul style="list-style-type: none"> a. Gelap b. Ruang c. Dingin 	
4.	Fenol Hidrokuinon	<ul style="list-style-type: none"> 1. Daun Singkong <ul style="list-style-type: none"> a. Gelap b. Ruang c. Dingin 2. Daun Pandan <ul style="list-style-type: none"> a. Gelap b. Ruang c. Dingin 3. Daun Pepaya <ul style="list-style-type: none"> a. Gelap b. Ruang c. Dingin 	Warna hijau / hijau biru
5.	Steroid	<ul style="list-style-type: none"> 1. Daun Singkong <ul style="list-style-type: none"> a. Gelap b. Ruang c. Dingin 2. Daun Pandan <ul style="list-style-type: none"> a. Gelap b. Ruang c. Dingin 3. Daun Pepaya <ul style="list-style-type: none"> a. Gelap b. Ruang c. Dingin 	Perubahan dari merah menjadi biru/ hijau

2. ANALISA TOTAL FENOL

A. Pendahuluan

Harborne (2006) menyatakan bahwa senyawa fenol merupakan senyawa yang mengandung gugus aromatik dan gugus hidroksil. Keberadaan gugus aromatik mengakibatkan senyawa fenol menampakkan penyerapan yang kuat pada spektrum ultraviolet. Senyawa fenol terdiri atas berbagai golongan, di antaranya adalah asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid, antosianin, flavonol, tanin, kuinon, maupun turunannya berupa polifenol. Golongan senyawa-senyawa ini dimiliki berbagai macam tumbuhan, salah satunya adalah teh yang kaya akan senyawa fenol maupun turunannya.

B. Tujuan

Tujuan praktikum adalah untuk menganalisa kadar fenol total pada sampel uji berupa teh hitam dan teh hijau.

C. Bahan Dan Alat

Alat yang digunakan pada praktikum analisa total fenol adalah : 1).Beaker gelas, 2).Blender, 3).Neraca analitik, 4).Penangas air, 5).Penjepit tabung reaksi, 6).Pipet tetes, 7).Rak tabung reaksi, 8).Spatula, 9).Tabung reaksi.

Bahan yang digunakan pada praktikum analisa total fenol adalah : 1).Aquadest, 2).Etanol 95%, 3).Folin Ciocalteu 50%, 4). Na_2CO_3 , 5).Teh Bendera, 6).Teh Botol Sosro, 7).Teh Sariwangi

D. Cara Kerja

Bahan yang digunakan pada praktikum ini adalah daun singkong, daun pandan, daun pepaya, daun sirsak, daun kapuk, daun salam

Cara kerja praktikum analisa total fenol adalah :

1. Sebanyak 10mg sampel uji dilarutkan dengan 2mL etanol 95% dan dikocok dengan vortex selama 2 menit.

2. Sebanyak 0,5mL campuran sampel dicampurkan dengan 0,5mL etanol 95% dan 2,5mL air suling/aquadest.
3. Folin Ciocalteu 50% sebanyak 2,5mL ditambahkan ke dalam campuran sampel.
4. Campuran dihomogenisasi dengan vortex dan didiamkan selama 5 menit.
5. Sebanyak 1mL Na₂CO₃ 5% ditambahkan ke dalam campuran.
6. Campuran dihomogenisasi dengan vortex, lalu didiamkan selama 30 menit dalam ruang gelap.
7. Larutan blanko dibuat sesuai cara kerja tanpa pemberian sampel uji.
8. Pengukuran absorbansi sampel dan blanko dilakukan dengan spektrofotometer.

E. Hasil Dan Pembahasan

Sampel	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	Total Fenol (mg/L)
Teh hijau			
Teh Hitam			

3. ANALISA AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

A. Pendahuluan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat radikal bebas dengan berperan sebagai donor H terhadap radikal bebas, sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil (Harborne, 2006). Antioksidan dapat berupa BHT, vitamin C, maupun senyawa fitokimia yang secara sengaja ataupun tidak sengaja terkandung dalam suatu produk pangan. Jus buah adalah salah satu produk pangan yang potensial dikembangkan dengan kandungan antioksidan.

Maraknya peredaran jus buah yang diklaim kaya akan antioksidan menuntut perlunya dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif pada sampel jus buah yang dijual bebas di pasaran. Melalui uji aktivitas antioksidan ini, kita dapat memastikan dan membandingkan kandungan antioksidan pada masing-masing sampel jus buah.

B. Tujuan

Tujuan praktikum adalah untuk menganalisa aktifitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

C. Bahan Dan Alat

Alat yang digunakan pada praktikum aktifitas antioksidan adalah : 1).Beaker gelas, 2).Penangas air, 3).Penjepit tabung reaksi, 4).Pipet tetes, 5).Pipet ukur, 6).Rak tabung reaksi, 7).Spektrofotometer, 8).Tabung reaksi, 9).Vortex.

Bahan yang digunakan pada praktikum aktifitas antioksidan adalah : 1).Aquadest, 2).DPPH, 3) Jus berbagai merek 4).Metanol

D. Cara Kerja

Cara kerja praktikum aktivitas antioksidan adalah :

1. Sebanyak 5mL sampel uji diencerkan hingga mencapai 50mL.
2. Larutan sampel dibuat menjadi 4 seri pengenceran, yaitu 0,5,10 dan 15.

3. Masing-masing seri pengenceran diambil 1mL dan diberi tambahan 7mL metanol.
4. Selanjutnya dilakukan penambahan 2mL larutan DPPH.
5. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 517nm.
6. Hasil peneraan spektrofotometer pada menit ke-30 dicatat.
7. Kapasitas antioksidan sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Kapasitas antioksidan} = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100\%$$

8. Nilai IC50 ditentukan dengan kurva standar.

E. Hasil Dan Pembahasan

Sampel	Pengenceran	Konsentrasi	Abs. Sampel	Abs. Blanko	Kapasitas Antioksidan (%)	Nilai IC50
	0					
	5					
	10					
	15					

4. ANALISA KLOOROFIL

A. Pendahuluan

Klorofil merupakan pigmen pemberi warna hijau pada tumbuhan dan beberapa jenis alga. Struktur dasar klorofil merupakan cincin porifirin yang menyerupai sel darah merah atau *heme* pada molekul hemoglobin. Akan tetapi, inti molekul dari klorofil adalah Mg atau magnesium, sedangkan pada *heme* adalah Fe atau besi. Cincin porifirin pada struktur klorofil merupakan struktur yang hidrofilik atau larut air, tetapi klorofil terikat pada gugus hidrokarbon yang tidak larut air atau hidrofobik, yaitu fitol (Muchtadi, 2012).

Pengukuran klorofil secara analisa laboratorium memiliki banyak metode, antara lain: metode kolorimetri yang diperkenalkan oleh Harvey (1934), metode spektrofotometri yang diperkenalkan oleh Richard dan Thomson (1952) dan metode kertas kromatografi yang diperkenalkan oleh Jeffrey dan Allen (1967) yang digunakan dalam penelitian dalam kondisi khusus. Metode kolorimetri merupakan metode perbandingan warna sampel klorofil dengan larutan standar dengan warna bertingkat dengan standar satuan HPPU (*Harvey Plant Pigment unit*). Metode kolorimetri mengharuskan kecermatan peneliti terhadap warna, sehingga memiliki unsur subjektif terhadap warna tersebut. Metode spektrofotometri merupakan mengukur klorofil berdasarkan panjang gelombang. Ketelitian metode spektrofotometri ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain: a. Panjang gelombang, b. Kadar zat terlarut yang diperiksa, c. Koefisien penyerapan panjang gelombang yang digunakan, d. Panjang lintas cahaya dalam *cuvette* (Riyono, 2006).

B. Tujuan

Tujuan dari praktikum ini adalah untuk menganalisa kandungan klorofil pada beberapa sampel tumbuhan.

C. Bahan Dan Alat

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah: 1) aseton, 2) daun jambu, 3) daun mahkota dewa, 4) daun mangga, 5) daun pepaya, 6) daun sirih, dan 7) daun sirih

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah: 1) gelas ukur, 2) kertas saring, 3) mortar. 4) pipet tetes, 5) pipet ukur, dan 6) spektrofotometer.

D. Cara Kerja

Cara kerja yang dilakukan dalam praktikum kali ini yaitu :

1. Daun segar sebanyak 100 mg dihaluskan dalam mortar yang diberi 2 mL aseton 80%
2. Hasil gerusan daun ditambahkan aseton hingga volume larutan menjadi 10 mL, kemudian disaring menggunakan kertas filter Whatman 41
3. Filtrat yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang 663 dan 645 nm

$$\text{Klorofil total (mg/L)} = (20,2 \times A_{645}) + A_{663}$$

E. Hasil dan Pembahasan

No	Sampel	Panjang Gelombang		Klorofil Total (mg/L)
		645 nm	663 nm	
1	Daun Sirsak			
2	Daun Jambu			
3	Daun Sirih			
4	Daun Mangga			
5	Daun Mahkota Dewa			
6	Daun Pepaya			

5. ANALISA TOTAL KAROTEN

A. Pendahuluan

Karotenoid adalah pigmen alami yang disintesis oleh tanaman, algae dan bakteri fotosintetik yang memberikan warna kuning, jingga dan merah. Karotenoid yang umum dikonsumsi, antara lain: α -karoten, β -karoten, β -kriptosantin, lutein, likopen dan zeasantin. α -karoten, β -karoten, dan β -kriptosantin merupakan provitamin A yang berarti dapat dikonversi menjadi retinol (Vitamin A). Karotenoid dibagi menjadi dua, yaitu karoten (α -karoten, β -karoten dan likopen) dan santofil (β -kriptosantin, lutein, dan zeasantin). Karotenoid memiliki beberapa manfaat, antara lain: aktivitas vitamin A, aktivitas antioksidan, filter cahaya, pencegah penyakit kanker paru-paru dan prostat, penyakit kardiovaskuler, serta katarak (Muchtadi, 2012).

Karotenoid merupakan senyawa isoprenoid yang dihasilkan dari salah satu jalur asam mevalonat. Jalur asam mevalonat tidak hanya membentuk senyawa isoprenoid saja tetapi juga membentuk senyawa metabolit lain; diantaranya isoflavonoid, indol alkaloid, diterpenoid, dan triterpenoid (Kurniawan, 2010)

Pengukuran karotenoid dan klorofil menggunakan metode yang sama. Perbedaan pengukuran karotenoid dengan klorofil hanya terdapat pada panjang gelombang yang dipakai pada metode spektrofotometri. Spektrofotometri sinar tampak merupakan pengukuran sejumlah serapan elektromagnetik monokromatis pada panjang gelombang tertentu oleh suatu molekul atau zat kimia penyerap dimana nilai serapan sebanding dengan konsentrasi zat penyerap tersebut, pengukuran dilakukan pada daerah visibel yaitu 380 – 780 nm. Spektrum ultra violet dan cahaya tampak suatu zat pada umumnya tidak mempunyai derajat spesifikasi tinggi, walaupun demikian spektrum tersebut sesuai untuk pemeriksaan kuantitatif (Mufsiroh, 2009).

B. Tujuan

Tujuan dari praktikum ini adalah untuk mengetahui kadar karotenoid dari berbagai sampel tumbuhan.

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah : 1) ball pipet, 2) beaker gelas, 3) cuvet, 4) gelas ukur, 5) kertas filter, 6) pipet volum, 7) spektrofotometer, 8) tabung reaksi.

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah : 1) aquadest, 2) aseton 80%, 3) daun jambu, 4) daun mahkota dewa, 5) daun mangga, 6) daun sirih, 7) daun sirsak, 8) daun papaya.

D. Cara Kerja

Cara kerja yang dilakukan dalam praktikum kali ini yaitu :

1. Daun segar sebanyak 100 mg dihaluskan dalam mortar yang diberi 2 mL aseton 80%
2. Hasil gerusan daun ditambahkan aseton hingga volume larutan menjadi 10 mL, kemudian disaring menggunakan kertas filter Whatman 41
3. Filtrat yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang 480, 645 dan 663 nm

$$\text{Karetonoid (mg/L)} = \frac{(A_{480} + (0,114 \times A_{663})) - (0,638 \times A_{645} \times V \cdot 10^3)}{112,5 \times W}$$

E. Hasil dan Pembahasan

Hasil yang diperoleh dari praktikum analisa klorofil pada beberapa daun yaitu sebagai berikut :

Tabel 1. Analisa karoten

No	Sampel	Panjang Gelombang	Karotenoid (mg/L)
----	--------	-------------------	-------------------

1	Daun Sirsak
2	Daun Jambu
3	Daun Sirih
4	Daun Mangga
5	Daun Mahkota Dewa
6	Daun Pepaya

DAFTAR PUSTAKA

Arpah, M. 1993. Pengawasan Mutu Pangan. Bandung: TARSITO.

Gajalakshmi S., Vijayalakshmi S, Devi RV. 2012. Phytological and pharmalogical properties of *Annona muricata* . International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4(2): 3-6.

Harborne, J.B. 2006. Metode Fitokimia. Bandung: Penerbit ITB.

Romansyah, Y. 2011. Kandungan senyawa bioaktif antioksidan karang lunak *Sarcophyton sp.* alami dan transplantasi di perairan Pulau Pramuka Kepulauan Seribu. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.

Kurniawan, M., *et al.* 2010. Kandungan Klorofil, Karotenoid, dan Vitamin C pada Beberapa Spesies Tumbuhan Akuatik. Buletin Anatomi dan Fisiologi XVIII (1) : 28-40

Muchtadi, Deddy. 2012. Pangan Fungsional dan Senyawa Bioaktif. Penerbit Alfabeta: Bandung.

Musfiroh, I., *et al.* 2009. Analisis proksimat dan penetapan kadar β -karoten dalam selai lembaran terung belanda (*Cyphomandra betacea* sendtn.) dengan metode spektrofotometri sinar tampak. Makalah Seminar tidak dipublikasi. Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran. Universitas Padjajaran.

Riyono, Sumijo H.. 2006. Beberapa Metode Pengukuran Klorofil Fitoplankton di Laut. *Oseana* XXXI(3) : 33-44.

Riyono, Sumijo H.. 2006. Beberapa Metode Pengukuran Klorofil Fitoplankton di Laut. *Oseana* XXXI(3) : 33-44.

Sumenda, L., *et al.* 2011. Analisi Kandungan Klorofil Daun Mangga (*Mangifera indica* L.) pada Tingkat Perkembangan Daun Yang Berbeda. *Jurnal Bioslogos* 1(1) : 20-24.

Venkatachalam, R. N., *et al.* 2012. Phytochemical Screening And In Vitro Antioxidant Activity Of *Psidium guajava*. *Free Radicals and Antioxidants* 2(1): 33-36