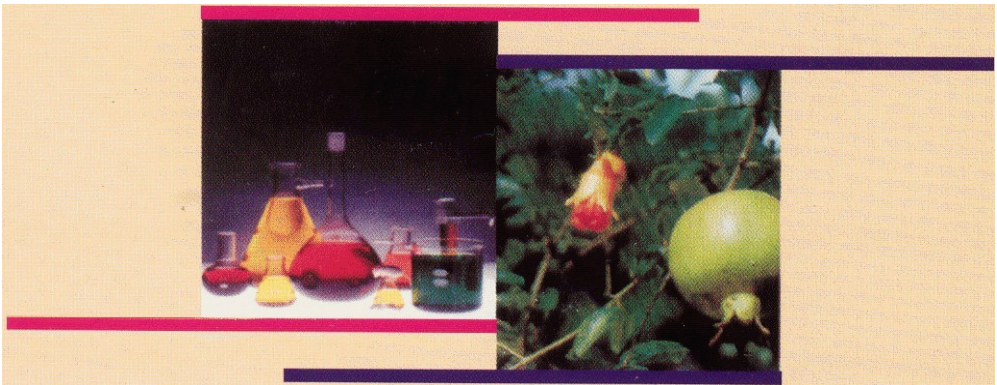




615.32
Ind
p

• **ARAMETER STANDAR**
K T UMUM EKSTRA
TUMBUHAN OBA



DEPARTEMEN KESEHATAN RI
DIREKTORAT JENDERA, L PENGAWASA.N OBAT DAN MAKANAN
DIREKTORAT PENGAWASAN OBAT TRADISIONAL

2000



PARAMETER STANDAR UMUM
EKSTRAK TUMBUHAN OBAT

615.32

Ind
p



Cetakan Pertama

DEPARTEMEN KESEHATAN RI
DIREKTORAT JENDERAL PENGAWASAN OBAT DAN MAKANAN
DIREKTORAT PENGAWASAN OBAT TRADISIONAL
2000

Katalog Dalam Terbitan. Departemen Kesehatan RI

615.32

Ind

Indonesia. Departemen Kesehatan. Direktorat Jenderal Pengawasan
Obat dan Makanan.

p

Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat.

- - Jakarta : Departemen Kesehatan, 2000.

I. Judul

1. DRUG

2. PLANTS, MEDICINAL



MENTERIKESIHATAN
REPUBLIK INDONESIA

KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

No : 55/MENKES/SK/1/2000

Tentang

**PENGESAHAN BUKU PARAMETER STANDAR UMUM EKSTRAK
TUMBUHAN OBAT**

MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

- Menimbang :
- a. bahwa sesuai ketentuan perundang-undangan yang berlaku, obat tradisional yang beredar di Indonesia harus memenuhi persyaratan mutu, keamanan dan kemanfaatan;
 - b. bahwa ekstrak tumbuhan obat yang merupakan salah satu bentuk bahan penyusun obat tradisional sangat menentukan mutu, keamanan dan kemanfaatan obat tradisional;
 - c. bahwa untuk itu perlu disusun Standar Mutu, Keamanan dan Kemanfaatan Ekstrak Tumbuhan Obat;
 - d. bahwa untuk penyusunan Standar Mutu, Keamanan dan Kemanfaatan Ekstrak Tumbuhan Obat perlu ditetapkan terlebih dahulu Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.
- Mengingat
- 1. Undang-undang No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara No. 100 Tahun 1992; Tambahan Lembaran Negara No. 3495 Tahun 1992).
 - 2. Peraturan Pemerintah No. 72 Tahun 1998 tentang Pengamanan Sediaan Farmasi dan Alat Kesehatan (Lembaran Negara No. 138 Tahun 1998; Tambahan Lembaran Negara No. 3781 Tahun 1998).
 - 3. Keputusan Menteri Kesehatan RI No. 659/Menkes/SK/X/1991 tentang Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik.
 - 4. Surat Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. HK. 00.06.5.04199 tanggal 18 Oktober 1999 tentang Tim Penyusun Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.

MEMUTUSKAN

Menetapkan
Pertama

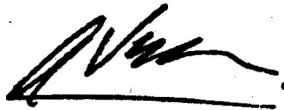
Mengesahkan buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat sebagai buku persyaratan mutu bahan baku berbentuk ekstrak yang berlaku di Indonesia.

Kedua

Keputusan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan dan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam keputusan ini akan diadakan perbaikan kembali sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada Tanggal : 13 Januari 2000

MENTERI KESEHATAN RI

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Achmad Sujudi', written over a horizontal line. To the left of the signature is a small black square symbol.

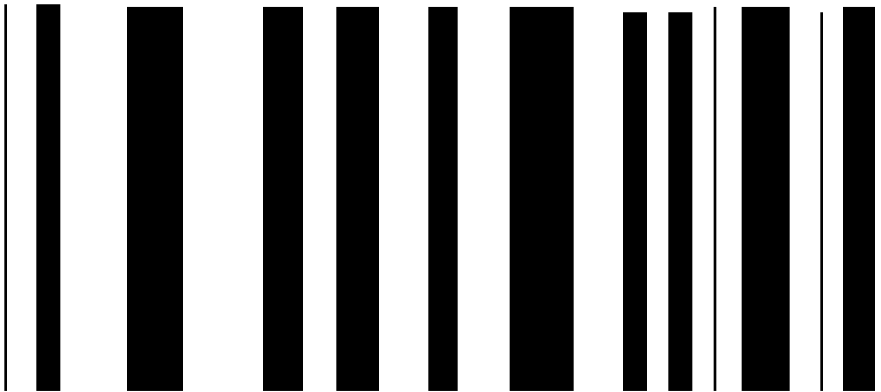
Dr. AchmadSujudi

KATA PENGANTAR

Dalam rangka meningkatkan mutu, keamanan dan kemanfaatan obat tradisional, salah satu langkah yang dilakukan Departemen Kesehatan adalah standardisasi bahan baku yang digunakan dalam produksi obat tradisional, termasuk standardisasi ekstrak.

Melalui kerjasama dengan beberapa pakar dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada serta Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Padjadjaran, dan atas perkenan Tuhan Yang Maha Esa, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI telah dapat menyusun dan menerbitkan "Buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat".

Buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat ini merupakan pedoman wajib bagi Industri Ekstrak dan Industri Obat Tradisional dalam membuat ekstrak.



DAFTAR ISI

	Halaman
SK MENTERI KESEHATAN RI.....	iii
KATA PENGANTAR	v
TIM PENYUSUN	vi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II SIMPLISIA DAN EKSTRAK	3
2.1 Simplisia	3
2.2 Ekstrak	5
BAB III FAKTOR YANG BERPENGARUH PADA MUTU EKSTRAK	
3.1 Faktor biologi	7
3.2 Faktor kimia	7
BABIV TEKNOLOGI EKSTRAKSI	9
4.1 Proses Pembuatan Ekstrak.....	9
4.1.1 Pembuatan serbuk simplisia dan klasifikasinya ..	9
4.1.2 Cairan pelarut	9
4.1.3 Separasi dan pemurnian	10
4.1.4 Pemekatan/penguapan (vaporasi dan evaporasi)	10
4.1.5 Pengeringan ekstrak	10
4.1.6 Rendemen	10
4.2 Metode ekstraksi	10
4.2.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut..	10
4.2.2 Destilasi uap	11
4.2.3 Cara ekstraksi lainnya	12
BABV PARAMETER DAN METODE UJI EKSTRAK.....	13
5.1 Parameter Non Spesifik	13
5.1 .1. Susut pengeringan dan bobot jenis	13
5.1.2 Kadar air.....	14
5.1.3 Kadar abu	17
5.1.4 Sisa pelarut	17
5.1.5 Residu pestisida	20
5.1.6 Cemaran logam berat	21
5.1 . 7 Cernaran mikroba	24

5.2. Parameter spesifik	30
5.2.1. Identitas ..	30
5.2.2 Organoleptik	31
5.2.3 Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu	31
5.3 Metode uji kandungan kimia ekstrak	32
5.3.1 Pola kromatogram	32
5.3.2 Kadar total golongan kandungan	33
5.3.3 Kadar kandungan kimia tertentu	37

BAB VI : KEPUSTAKAAN

LAMPIRAN	40
1. Gambar skema alat-alat ekstraksi	40
2. Instrumen analisis kromatografi	42
3. Validasi metode analisis kadar	43
4. Metode analisis multiresidu pestisida organoklor dan organofosfat	44
5. Metode cemaran mikroba	59
6. Alat penetapan kadar air (Destilasi Toluena)	65
7. Alat penetapan kadar minyak atsiri	67
8. Tabel bobot jenis dan kadar etanol	68
9. Daftar pereaksi dan larutan percobaan	68

BABI PENDAHULUAN

Memasuki abad ke-21 sebagai era globalisasi, perkembangan teknologi dan bentuk pemanfaatan tumbuhan obat di Indonesia dalam pelayanan kesehatan sudah mengenal serta menggunakan konsep ekstrak. Hal ini merupakan peluang dan sekaligus tantangan pada perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kefarmasian serta pertanian dan kedokteran di Indonesia.

Iptek kefarmasian telah berkembang pula pada bidang ekstraksi, analisis dan teknologi proses sehingga dapat menerima ekstrak sebagai bentuk bahan yang dapat dipertanggung jawabkan mutu dan keajegan kandungan kimianya. Inilah yang disebut sebagai paradigma ekstrak terstandar. baik sebagai bahan baku, bahan antara ataupun bahan produk.

Iptek kedokteran (modern) juga mulai dapat membuka diri pada konsep ekstrak terstandar sebagai bentuk obat multi-komponen yang dapat dipertanggung jawabkan dari aspek konsep keamanan, farmakologi dan khasiatnya. Kemajuan biologi molekuler, kultur sel serta biomedik lainnya telah dapat dikembangkan berbagai uji untuk mengkonfirmasi respon biologis sampai respon klinis dari terapi dengan ekstrak sebagai model multikomponen.

Ekstrak sebagai hasil atau produk proses iptek kefarmasian yang selanjutnya diberi landasan iptek kedokteran. sebenarnya dapat dipandang juga sebagai inovator dan motivator iptek pertanian. Produk hasil pertanian tumbuhan obat tidak saja menjadi dan sampai pada bentuk simplisia, namun juga sampai pada bentuk ekstrak sebagai komoditi agrobisnis, melalui industri ekstrak. Untuk mencapai suatu ekstrak yang dikehendaki sebagai produk unggulan, tentu saja selanjutnya memacu iptek pertanian untuk meneliti dan mengembangkan konsep tumbuhan obat unggulan, sebagai bahan baku ekstrak.

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus. Simplisia yang keras seperti biji, kulit kayu dan kulit akar susah diserap oleh pelarut, karena itu perlu diserbuk sampai halus. Disamping memperhatikan

sifat fisik dan senyawa aktif dari simplisia harus juga diperhatikan senyawa-senyawa lain yang terdapat dalam simplisia seperti protein,

karbohidrat, lemak dan gula, karena senyawa ini akan mempengaruhi tingkat kejenuhan pelarut sehingga akan berpengaruh pula pada proses pelarutan senyawa aktif. Kejagaan kadar senyawa aktif merupakan syarat mutlak mutu ekstrak yang diproduksi. Oleh sebab itu setiap ekstrak harus distandardisasi.

Standardisasi dalam kefarmasian tidak lain adalah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait paradigma mutu kefarmasian, mutu dalam artian memenuhi syarat standar (kimia, biologi dan farmasi), termasuk jaminan (batas-batas) stabilitas sebagai produk kefarmasian umumnya. Persyaratan mutu ekstrak terdiri dari berbagai parameter standar umum dan parameter standar spesifik. Pemerintah melakukan fungsi pembinaan dan pengawasan serta melindungi konsumen untuk tegaknya trilogi "mutu-keamanan-manfaat". Pengertian standardisasi juga berarti proses menjamin bahwa produk akhir (obat ekstrak atau produk ekstrak) mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan (ajeg) dan ditetapkan (dirancang dalam formula) terlebih dahulu.

Dalam buku pedoman parameter standar umum ekstrak ini, dibahas berbagai landasan ilmiah rancangan serta konsep metode, prosedur yang diperlukan dalam rangkaian standardisasi ekstrak sebagai suatu bentuk bahan baku dan produk kefarmasian yang bermutu, aman serta bermanfaat.

BAB II

SIMPLISIA DAN EKSTRAK

Simplisia tumbuhan obat merupakan bahan baku proses pembuatan ekstrak, baik sebagai bahan obat atau produk.

Ekstrak tumbuhan obat sebagai bahan dan produk, dibuat dari bahan baku tumbuhan obat.

2.1. Simplisia

Dalam buku "**Materia Medika Indonesia**" ditetapkan definisi bahwa simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan ialah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa kimia murni.

Materia Medika Indonesia berlaku sebagai pedoman untuk simplisia yang akan dipergunakan untuk keperluan pengobatan, tetapi tidak berlaku bagi bahan yang dipergunakan untuk keperluan lain yang dijual dengan nama yang sama. Namun simplisia (untuk selanjutnya dalam naskah ini berarti simplisia nabati) secara umum merupakan produk hasil pertanian tumbuhan obat setelah melalui proses pasca panen dan proses preparasi secara sederhana menjadi bentuk produk kefarmasian yang siap dipakai atau siap diproses selanjutnya, yaitu :

- (1) Siap dipakai dalam bentuk serbuk halus untuk diseduh sebelum diminum (jamu).
- (2) Siap dipakai untuk dicacah dan digodok sebagai jamu godokan (infus).
- (3) Diproses selanjutnya untuk dijadikan produk sediaan farmasi lain yang umumnya melalui proses ekstraksi, separasi dan pemurnian, yaitu menjadi ekstrak, fraksi atau bahan isolat senyawa murni. Departemen Kesehatan telah menerbitkan buku petunjuk umum "**Cara Pembuatan simplisia**" dan buku "**Sediaan Galenik**".

Simplisia sebagai produk hasil pertanian atau pengumpulan tumbuhan liar (wild crop) tentu saja kandungan kimianya tidak dapat dijamin selalu ajeg (konstan) karena disadari adanya variabel bibit, tempat tumbuh, iklim, kondisi (umur dan cara) panen, serta proses pasca panen dan preparasi akhir. Walaupun ada juga pendapat bahwa variabel tersebut tidak besar akibatnya pada mutu ekstrak nantinya dan dapat dikompensasi dengan penambahan/pengurangan bahan setelah sedikit prosedur analisis kimia dan sentuhan inovasi teknologi farmasi lanjutan sehingga tidak berdampak banyak pada khasiat produknya. Usaha untuk mengajegkan

variabel tersebut dapat dianggap sebagai usaha untuk menjaga keajegan mutu simplisia.

Dalam perkembangan selanjutnya, tahapan usaha menjamin keajegan kandungan kimia diserahkan pada tahapan teknologi fitofarmasi. Prociuk tumbuhan obat dari tahap pertanian yaitu simplisia berubah posisi menjadi bahan dasar awal serta ekstrak sebagai bahan baku obat dan produk sediaan.

Variasi senyawa kandungan dalam produk hasil panen tumbuhan obat (*in vivo*) disebabkan aspek sebagai berikut :

- (1) Genetik (bibit) ;
- (2) Ungkungan (tempat tumbuh. Iklim);
- (3) Rekayasa agronomi (fertilizer, perlakuan selama masa tumbuh);
- (4) Panen (waktu dan pasca panen).

Besarnya variasi senyawa kandungan meliputi baik jenis ataupun kadarnya. sehingga timbul jenis (*species*) lain yang disebut kultivar. Namun sebaliknya bahwa kondisi dimana variabel tersebut menghasilkan produk yang optimal atau bahkan unggulan secara kirrua maka dikenal obsesi adanya bibit unggul dan produk unggulan serta daerah sentra agrobisnis. dimana tumbuhan obat unggulan tersebut ditanam.

Proses pemanenan dan preparasi simplisia merupakan proses yang dapat menentukan mutu simplisia dalam berbagai artian, yaitu komposisi senyawa kandungan, kontaminasi dan stabilitas bahan. Namun demikian simplisia sebagai produk olahan, variasi senyawa kandungan dapat diperkecil. diatur atau diajapkan. Hal ini karena penerapan (aplikasi) iptek pertanian pasca panen yang terstandar.

Dalam hal simplisia sebagai bahan baku (awal) dan produk siap dikonsumsi langsung, dapat dipertimbangkan 3 konsep untuk menyusun paraterstandar umum :

- (1) Bahwa simplisia sebagai bahan kefarmasian seharusnya memenuhi 3 parameter mutu umum suatu bahan (material), yaitu kebenaran jenis (identifikasi), kemurnian (bebas dari kontaminasi kimia dan biologis) serta aturan penstabilan (wadah, penyimpanan dan transportasi).
- (2) Bahwa simplisia sebagai bahan dan produk konsumsi manusia sebagai obat tetap diupayakan memenuhi 3 paradigma seperti produk kefarmasian lainnya, yaitu Quality-Safety-Efficacy(Mutu-Aman-Manfaat).
- (3) Bahwa simplisia sebagai bahan dengan kandungan kimia yang bertanggung jawab terhadap respon biologis harus mempunyai spesifikasi kimia, yaitu informasi komposisi (jenis dan kadar) senyawa kandungan.

Standardisasi suatu simplisia tidak lain pemenuhan terhadap persyaratan sebagai bahan dan penetapan nilai berbagai parameter dari produk seperti yang ditetapkan sebelumnya.

Standardisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (Materia Medika Indonesia). Sedangkan sebagai produk yang langsung dikonsumsi (serbukjamu dsb.) masih harus memenuhi persyaratan produk kefarmasian sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Dalam bentuk bahan dan produk kefarmasian baru, yaitu ekstrak, maka selain persyaratan monografi bahan baku (simplisia), juga diperlukan persyaratan parameter standar umum dan spesifik. Parameter spesifik ekstrak yang sebagian besar berupa analisis kimia yang memberikan informasi komposisi senyawa kandungan Genis dan kadar) nantinya lebih banyak tercantum di buku khusus monografi ekstrak tumbuhan obat. Demikian juga dari data analisis kimia ini dapat menentukan aspek bisnis sebagai komoditi produk galenik dan proses teknologi fitofarmasi dalam rangkaian produksi produk jadi mengandung ekstrak.

Berdasarkan trilogi mutu-aman-manfaat, maka simplisia sebagai bahan baku ekstrak tetap harus lebih dahulu memenuhi persyaratan monografinya, yaitu buku Materia Medika Indonesia. Dan kemudian dalam proses seterusnya, produk ekstrak juga harus memenuhi persyaratannya, yaitu parameter standar umum dan spesifiknya dalam buku monografi.

2.2 Ekstrak

Dalam buku Farmakope Indonesia Edisi 4, disebutkan bahwa:

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh perkolat biasanya dipekatkan secara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan sesedikit mungkin terkena panas.

Ekstrakcair adalah sediaan dari simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet. Jika tidak dinyatakan lain pada masing-masing monografi tiap ml ekstrak mengandung senyawa aktif dari 1 g simplisia yang memenuhi syarat. Ekstrak cair yang cenderung membentuk endapan dapat didiamkan dan disaring atau bagian yang bening di enap tuangkan (dekantasi). Beningan yang diperoleh memenuhi persyaratan Farmakope. Ekstrak cair dapat dibuat dari ekstrak yang sesuai.

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Campur simplisia dengan derajat halus yang sesuai dalam panci dengan air

secukupnya, panaskan di atas tangas air selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sekali-sekali diaduk. Serkai selagi panas melalui kain flanel,

tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume infus yang dikehendaki (jika tidak dikatakan lain, dibuat infus 10%).

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi produk jadi. Ekstrak sebagai bahan antara berarti masih menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal ataupun tetap sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita.

Terpenuhinya standar mutu produk/bahan ekstrak tidak terlepas dari pengendalian proses, artinya bahwa proses yang terstandar dapat menjamin produk terstandar. Inilah hal yang sementara ini banyak dilakukan, yaitu dengan bahan baku terstandar dan proses yang terkendali/terstandar, maka akan diperoleh produk/bahan ekstrak terstandar tanpa penerapan pengujian atau pemeriksaan. Namun hal ini tidak dapat dibiarkan untuk masa depan era globalisasi. Pengujian atau pemeriksaan persyaratan parameter standar umum ekstrak mutlak harus dilakukan dengan berpegang pada manajemen pengendalian mutu eksternal oleh badan formal atau/dan badan independen.

BAB 11

FAKTOR YANG BERPENGARUH PADA MUTU EKSTRAK

3.1. Faktor biologi

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tumbuhan obatnya dan khusus dipandang dari segi biologi. Faktor biologi, baik untuk bahan dari tumbuhan obat hasil budidaya (kultivar) ataupun dari tumbuhan liar (wild crop) yang meliputi beberapa hal, yaitu :

- (1) Identitas jenis (species) : Jenis tumbuhan dari sudut keragaman hayati dapat dikonfirmasi sampai informasi genetik sebagai faktor internal untuk validasi jenis (species).
- (2) Lokasi tumbuhan asal : Lokasi berarti faktor eksternal, yaitu lingkungan (tanah dan atmosfer) dimana tumbuhan berinteraksi berupa energi (cuaca: temperatur, cahaya) dan materi (air, senyawa organik dan anorganik).
- (3) Periode pemanenan hasil tumbuhan : Faktor ini merupakan dimensi waktu dari proses kehidupan tumbuhan terutama metabolisme sehingga menentukan senyawa kandungan. Kapan senyawa kandungan mencapai kadar optimal dari proses biosintesis dan sebaliknya kapan sebelum senyawa tersebut dikonversi/dibiotransformasi/biodegradasi menjadi senyawa lain.
- (4) Penyimpanan bahan tumbuhan : Merupakan faktor eksternal yang dapat diatur karena dapat berpengaruh pada stabilitas bahan serta adanya kontaminasi (biotik dan abiotik).
- (5) Umur tumbuhan dan bagian yang digunakan.

Selain 5 faktor tersebut, maka untuk bahan dari tumbuhan obat hasil budidaya (kultivar) ada lagi faktor GAP (Good Agriculture Practice) sedang• kan untuk bahan dari tumbuhan liar (wild crop) ada faktor kondisi proses pengeringan yang umumnya dilakukan di lapangan.

3.2. Faktor kimia

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tumbuhan obatnya khususnya dipandang dari segi kandungan kimianya. Faktor kimia, baik untuk bahan dari tumbuhan obat hasil budidaya (kultivar) ataupun dari tumbuhan liar (wild crop), meliputi beberapa hal, yaitu :

- (a) Faktor internal
 - (1) Jenis senyawa aktif dalam bahan
 - (2) Komposisi kualitatif senyawa aktif
 - (3) Komposisi kuantitatif senyawa aktif
 - (4) Kadar total rata-rata senyawa aktif
- (b) Faktor eksternal
 - (1) Metode ekstraksi
 - (2) Perbandingan ukuran alat ekstraksi (diameter dan tinggi alat)
 - (3) Ukuran, kekerasan dan kekeringan bahan

- (4) Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
- (5) Kandungan logam berat
- (6) Kandungan pestisida

Mutu ekstrak ditinjau dan dipandang dari senyawa kimia yang dikandung dalamnya seiring dengan paradigma ilmu kedokteran modern, bahwa respon biologis yang diakibatkan oleh ekstrak pada manusia disebabkan oleh senyawa kimia, bukannya dari unsur lain seperti bioenergi dan spiritual.

Senyawa kimia dalam ekstrak ditinjau dari asalnya dapat dibedakan menjadi 4 kelompok, yaitu :

- (1) Senyawa kandungan asli dari tumbuhan asal.
Senyawa asli sebenarnya berarti senyawa yang memang sudah ada sejak masa tumbuhan tersebut hidup. Jika proses preparasi simplisia dan ekstraksi dijamin tidak menyebabkan perubahan kimia, maka hasil analisis kimia terhadap ekstrak mencerminkan komposisi senyawa kandungan asli.
- (2) Senyawa hasil perubahan dari senyawa asli.
Dari kajian dan riset memang sudah dapat diprediksi terjadi perubahan kimia senyawa asli karena memang sifat fisikokimia senyawa asli dan proses penstabilan yang sulit.
- (3) Senyawa kontaminasi, baik sebagai polutan atau aditif proses.
Senyawa kontaminasi merupakan senyawa eksogen yang tercampur pada ekstrak, baik polusi yang tidak terhindari atau sebagai sisa atau residu proses.
- (4) Senyawa hasil interaksi kontaminasi dengan senyawa asli atau senyawa perubahan.

Pengertian dan kesadaran akan adanya 4 kelompok senyawa terkandung dalam ekstrak akan meningkatkan validasi standardisasi dan parameter mutu ekstrak. Kelompok pertama dan kedua terkait dengan parameter standar umum yang bersifat spesifik sedangkan kelompok tiga dan empat merupakan parameter standar umum nonspesifik.

BABIV TEKNeLOGI EKSTRAKSI

4.1. PROSES PEMBUATAN EKSTRAK

4.1.1 Pembuatan serbuk simplisia dan klasifikasi~sinya

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering (penyerbukan). Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan dasar beberapa hal sebagai berikut:

- (1) Makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif-efisien, namun makin halus serbuk, maka makin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi.
- (2) Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam dll.) maka akan timbul panas (kalori) yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan. Namun hal ini dapat dikompensasi dengan penggunaan nitrogen cair.

4.1.2 Cairan pelarut

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik {optimal} untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisah dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung.

Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan penyari adalah sebagai berikut :

- { 1) Selektivitas
- (2) Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
- (3) Ekonomis
- (4) Ramah lingkungan
- (5) Keamanan

Namun demikian kebijakan dan peraturan pemerintah dalam hal ini juga ikut membatasi, cairan pelarut apa yang diperbolehkan dan mana yang dilarang. Pada prinsipnya cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi "pharmaceutical grade". Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya. Jenis pelarut lain seperti metanol dll.

{alkohol turunannya), heksana dll. {hidrokarbon alifatik), toluen dll. (hidrokarbon aromatik), kloroform (dan segolongannya), aseton, umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap separasi dan

tahap pemurnian (fraksinasi). Khusus metanol, dihindari penggunaannya

karena sifatnya yang toksik akut dan kronik, namun demikian jika dalam uji ada sisa pelarut dalam ekstrak menunjukkan negatif, maka metanol sebenarnya pelarut yang lebih baik dari etanol.

4.1.3 Separasi dan pemurnian

Tujuan dari tahapan ini adalah menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Sebagai contoh adalah senyawa tanin, pigmen-pigmen dan senyawa-senyawa lain yang akan berpengaruh pada stabilitas senyawa kandungan, termasuk juga dalam hal ini adalah sisa pelarut yang tidak dikehendaki. Proses-proses pada tahapan ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tak campur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorpsi dan penukar ion.

4.1.4 Pemekatan / Penguapan (vaporasi dan evaporasi)

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partial solute (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondensasi, ekstrak hanya menjadi kental/pekat.

4.1.5 Pengeringan ekstrak

Pengeringan berarti menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk. Masa kering-rapuh, tergantung proses dan peralatan yang digunakan. Ada berbagai proses pengeringan ekstrak, yaitu dengan cara:

- (1) Pengeringan Evaporasi.
- (2) Pengeringan Vaporasi.
- (3) Pengeringan Sublimasi.
- (4) Pengeringan Konveksi.
- (5) Pengeringan Kontak.
- (6) Pengeringan Radiasi.
- (7) Pengeringan Dielektrik.

4.1.6 Rendemen

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.

4.2 METODE EKSTRAKSI

4.2.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

(1) Cara dingin

Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi

termasuk eks• traksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseim-

banan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (exhaustive extraction) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1- 5 kali bahan.

(2) Cara panas

Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50°C.

Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15 - 20 menit).

Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (~30°C) dan temperatur sampai titik didih air.

4.2.2 Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atisiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan

diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

Destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi.

Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinu ikut terdestilasi.

4.2.3 Cara ekstraksi lainnya

- (1) Ekstraksi berkesinambungan.
Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturut-turut beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbaqi dalam beberapa bejana ekstraksi.
- (2) Superkritikal karbondioksida
Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak .
- (3) Ekstraksi Ultrasonik
Getaran ultrasonik (> 20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stres dinamik sertamenimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi.
- (4) Ekstraksi energi listrik
Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "electric-discharges" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonik.

BABV
PARAMETER DAN METODE UJI EKSTRAK

5.1 PARAMETER NON SPESIFIK

5.1.1 SUSUT PENGERINGAN DAN BOBOT JENIS

(1) PARAMETER SUSUT PENGERINGAN

PENGERTIAN DAN PRINSIP Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap/atsiri dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka.

TUJUAN Memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan.

NILAI Minimal atau rentang yang diperbolehkan.
Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi.

PROSEDUR

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 g sampai 2g dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Jika ekstrak yang diuji berupa ekstrak kental, ratakan dengan bantuan pengaduk. Kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar. Jika ekstrak sulit kering dan mencair pada pemanasan, ditambahkan 1 g silika pengering yang telah ditimbang seksama setelah dikeringkan dan disimpan dalam eksikator pada suhu kamar. Campurkan silika tersebut secara rata dengan ekstrak pada saat panas, kemudian keringkan kembali pada suhu penetapan hingga bobot tetap.

(2) PARAMETER BOBOT JENIS

PENGERTIAN Adalah masa per satuan volume pada suhu kamar tertentu

DAN PRINSIP (25°C) yang ditentukan dengan alat khusus piknometer atau alat lainnya.

TUJUAN Memberikan batasan tentang besarnya masa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang.

Memberikan gambaran kandungan kimia terlarut.

NILAI Minimal atau rentang yang diperbolehkan.
Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi

PROSEDUR

Gunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu

25°C. Atur hingga suhu ekstrak cair lebih kurang 20°C, masukkan ke dalam piknometer. Atur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C, buang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang. Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C.

5.1.2 KADAR AIR

PARAMETER KADAR AIR :

PENGETERIAN DAN PRINSIP Pengukurankandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi atau gravimetri.

TUJUAN Memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan.

NILAI Maksimal atau rentang yang diperbolehkan.
Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi

PROSEDUR

(1) Cara Titrasi

Pereaksi dan larutan yang digunakan peka terhadap air, hingga harus dilindungi dari pengaruh kelembaban udara.

Pereaksi Karl Fischer disimpan dalam botol yang diperlengkapi dengan buret otomatis. Untuk melindungi dari pengaruh kelembaban udara, buret dilengkapi dengan tabung pengering. Labu titrasi kapasitas lebih kurang 60 ml, dilengkapi dengan 2 elektroda platina, sebuah pipa pengalir nitrogen, sebuah sumbat berlubang untuk ujung buret dan sebuah tabung pengering. Zat yang diperiksa dimasukkan ke dalam labu melalui pipa pengalir nitrogen atau melalui pipa samping yang dapat disumbat. Pengadukan dilakukan dengan mengalirkan gas nitrogen yang telah dikeringkan atau dengan pengaduk magnet. Penunjuk titik akhir terdiri dari baterai kering 1,5 volt atau 2 volt yang dihubungkan dengan tahanan variabel lebih kurang 2.000 ohm. Tahanan diatur sedemikian rupa sehingga arus utama yang cocok yang melalui elektroda platina berhubungan secara seri dengan mikroammeter.

Setelah setiap kali penambahan pereaksi Karl Fischer, penunjuk mikroammeter menyimpangkan tetapi segera kembali ke

kedudukan semula. Pada titik akhir, penyimpangan akan tetap selama waktu yang lebih lama.

Untuk senyawa-senyawa yang melepaskan air secara perlahan-lahan, maka pada umumnya dilakukan titrasi tidak langsung. Kecuali dinyatakan lain dalam monografi maka penetapan kadar air dilakukan dengan titrasi langsung.

Cara penetapan

Titrasi langsung

Kecuali dinyatakan lain, masukkan lebih kurang 20 ml metanol P ke dalam labu titrasi. Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer hingga titik akhir tercapai. Masukkan dengan cepat sejumlah zat yang ditimbang saksama yang diperkirakan mengandung 10 mg sampai 50 mg air, ke dalam labu titrasi, aduk selama 1 menit. Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer yang telah diketahui kesetaraan airnya. Hitung jumlah air dalam mg dengan rumus :

$$V \times F$$

V adalah volume pereaksi Karl Fischer pada titrasi kedua, F adalah faktor kesetaraan air.

Titrasitidak langsung

Masukkan lebih kurang 20 ml metanol P ke dalam labu titrasi. Titrasi dengan pereaksi dari Karl Fischer hingga titik akhir tercapai. Masukkan dengan cepat sejumlah zat yang ditimbang saksama yang diperkirakan mengandung 10 mg sampai 50 mg air, campur. Tambahkan pereaksi Karl Fischer berlebihan dan yang diukur saksama, biarkan selama beberapawaktu hingga reaksi sempurna. Titrasi kelebihan pereaksi dengan larutan baku air-metanol. Hitung jumlah dalam mg, air, dengan rumus :

$$FV1 - aV2$$

F adalah faktor kesetaraan air pereaksi Karl Fischer, V1 adalah volume dalam ml pereaksi Karl Fischer yang diukur saksama, a adalah kadar air dalam mg tiap ml dari larutan baku air-metanol dan V2 adalah volume dalam ml larutan baku air-metanol.

Pereaksi

Pereaksi Karl-Fischer.

Larutkan 63 g jodium P dalam 100 ml piridina mutlak P, dinginkan dalam es, alirkan belerang dioksida P hingga bobot bertambah 32,3 g sambil dilindungi dari pengaruh kelembaban udara. Tambahkan metanol mutlak P secukupnya hingga 500 ml, biarkan selama 24 jam. Lakukan pembakuan sebagai berikut:

Masukkan lebih kurang 20 ml metanol mutlak P ke dalam labu titrasi. Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer tanpa mencatat volume yang digunakan. Masukkan air yang ditimbang saksama sejumlah yang cocok. Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer Hitung kesetaraan air dalam mg tiap ml pereaksi. Pereaksi Karl Fischer harus dibakukan segera sebelum

digunakan. Pereaksi Karl Fischer harus disimpan di lemari pendingin pada suhu antara 2°C dan 8°C, terlindung dari cahaya, 1 ml pereaksi Karl Fischer segar setara dengan lebih kurang 5 mg air.

Larutan baku air-metanol

Encerkan 2 ml air dengan metanol P secukupnya hingga 1.000,0 ml. Titrasi 25,0 ml larutan dengan pereaksi Karl Fischer. Hitung kadar air dalam mg tiap ml dengan rumus:

$$\frac{VF}{25}$$

V adalah volume dalam ml pereaksi Karl Fischer, F adalah faktor kesetaraan air. Ekstrak yang sulit diaduk seperti ekstrak kental tidak dapat ditetapkan dengan cara ini.

(2) Cara destilasi

A lat

Sebuah labu 500 ml (A) dihubungkan dengan pendingin air batik (C) dengan pertolongan alat penampung (B). Tabung penerima 5 ml (E), berskala 0,1 ml. Pemanas yang digunakan sebaiknya pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau tangas minyak. Bagian atas labu tabung penyambung (D) sebaiknya dibungkus dengan asbes.

Pereaksi

Toluen. Sejumlah toluen P, kocok dengan sedikit air, biarkan memisah, buang lapisan air suling.

Cara penetapan

Bersihkan tabung penerima dan pendingin dengan asam pencuci, bilasi dengan air, keringkan dalam lemari pengering. Ke dalam labu kering masukkan sejumlah ekstrak yang ditimbang saksama yang diperkirakan mengandung 2 ml sampai 4 ml air. Jika ekstrak berupa ekstrak kental, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Untuk ekstrak yang dapat menyebabkan gejala mendadak, tambahkan pasir kering yang telah dicuci secukupnya hingga mencukupi dasar labu atau sejumlah tabung kapiler, panjang lebih kurang 100 mm yang salah satu ujungnya tertutup. Masukkan lebih kurang 200 ml toluen ke dalam labu, hubungkan alat. Tuang toluen ke dalam tabung penerima (R) melalui alat pendingin. Panaskan labu hati-hati selama 15 menit.

Setelah toluen mural mendidih, suling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluen, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat temoaga dan lebih dibasahi dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima pendingin hingga suhu kamar. Jika ada tetes air

yang melekat pada pendingin tabung penerima, gosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan basahi dengan toluen hingga tetesan air tu run. Setelah air dan toluen memisah sempurna, baca volume air. Hitung kadar air dalam persen.

(3) Metode Gravimetri

Masukkan lebih kurang 10 gram ekstrak dan timbang saksama dalam wadah

yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Penetapan kadar air dengan metode ini tidak sesuai untuk ekstrak yang mempunyai kandungan minyak atsiri tinggi. Dalam hal demikian metode ini lebih tepat disebut penetapan susut pengeringan.

5.1.3 KADAR ABU

PARAMETER KADAR ABU

PENGERTIAN DAN PRINSIP	Bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap. Sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik.
TUJUAN	Memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak.
NILAI	Maksimal atau rentang yang diperbolehkan. Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi.

PROSEDUR

(1) Penetapan Kadar Abu

Lebih kurang 2 g sampai 3 g ekstrak yang telah digerus dan ditimbang saksama, dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan, timbang. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

(2) Penetapan Kadar Abu Yang Tidak Larut Dalam Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, didihkan dengan 25 ml asam sulfat encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

5.1.4 SISA PELARUT

PARAMETER SISA PELARUT

PENGERTIAN DAN PRINSIP Menentukan kandungan sisa pelarut tertentu (yang memang ditambahkan) yang secara umum dengan

kromatografi gas. Untuk ekstrak cair berarti kandungan pelarutnya, misalnya kadar alkohol.

TUJUAN

Memberikan jaminan bahwa selama proses tidak meninggalkan sisa pelarut yang memang seharusnya tidak boleh ada. Sedangkan untuk ekstrak cair menunjukkan jumlah pelarut (alkohol) sesuai dengan yang ditetapkan.

NILA!

Maksimal yang diperbolehkan, namun dalam hal pelarut berbahaya seperti kloroform nilai harus negatif sesuai batas deteksi instrumen.

Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi

PROSE DUR

(1) Cara Destilasi (Penetapan Kadar Etanol)

Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, lakukan penetapan dengan cara destilasi. Cara ini sesuai untuk penetapan sebagian besar ekstrak cair dan tingtura asalkan kapasitas labu destilasi cukup (umumnya 2 sampai 4 kali cairan yang akan dipanaskan) dan kecepatan destilasi diatur sedemikian sehingga diperoleh destilat yang jernih. Destilat yang keruh dapat dijernihkan dengan pengocokan menggunakan talk P atau kalsium karbonat P, saring, setelah itu suhu filtrat diatur dan kandungan etanol ditetapkan dari bobot jenis. Lakukan semua pekerjaan dengan hati-hati untuk mengurangi kehilangan etanol oleh penguapan.

Untuk mencegah buih yang mengganggu dalam cairan selama destilasi. tambahkan asam kuat seperti asam fosfat P, asam sulfat P atau asam tanat P atau cegah dengan penambahan larutan kalsium klorida P sedikit berlebih, atau sedikit parafin P atau minyak silikon sebelum destilasi. Cegah gejalak selama destilasi dengan penambahan keping• keping berpori dari bahan yang tidak larut seperti silikon karbida P, atau manik-manik.

Cara untuk cairan yang diperkirakan mengandung etanol 30% atau kurang. Pipet tidak kurang dari 25 ml cairan uji ke dalam alat destilasi yang sesuai, catatdestilasi hingga diperoleh destilat lebih kurang 2 ml lebih kecil dari volume cairan uji yang dipipet. Atur suhu destilat hingga sama dengan suhu pada waktu pemipetan. Tambahkan air secukupnya hingga volume sama dengan volume cairan uji. Destilatjemih atau keruh lemah dan hanya mengandung lebih dari sesepora sisa zat mudah menguap lainnya. Tetapkan bobot jenis cairan pada suhu 25°C seperti yang tertera pada Penetapan Bobot Jenis. Hitung persentase dalam volume dari etanol dalam cairan menggunakan Tabel Bobot Jenis dan Kadar Etanol.

Untuk cairan yang diperkirakan mengandung etanol lebih dari 30%, lakukan menurut cara di atas, lebih kurang dua kali volume cairan uji.

Kumpulkan destilat hingga lebih kurang 2 ml lebih kecil dari dua kali volume cairan uji yang dipipet, atur suhu sama dengan cairan uji.

Tambahkan air secukupnya hingga volume dua kali volume cairan uji yang dipipet, campur, dan tetapkan bobot jenis. Kadar etanol dalam volume destilat, sama dengan setengah kadar etanol dalam cairan uji etanol atau kurang. Pipet 25 ml cairan uji, masukkan ke dalam corong pisah, tambahkan air volume sama. Jenuhkan campuran dengan natrium klorida P, tambahkan 25 ml heksana P dan kocok untuk mengekstraksi zat mudah menguap lain yang mengganggu. Pisahkan lapisan bawah ke dalam corong pisah kedua. Ulangi ekstraksi dua kali, tiap kali dengan 25 ml heksana P. Ekstraksi kumpulan larutan heksana P tiga kali, tiap kali dengan 10 ml larutan jenuh natrium klorida P. Destilasi kumpulan larutan garam, tampung destilat hingga sejumlah volume mendekati volume cairan uji semula.

Untuk cairan yang diperkirakan mengandung etanol lebih dari 50% encerkan cairan uji dengan air hingga kadar etanol lebih kurang 25%, kemudian lanjutkan menurut cara di atas mulai dari "Jenuhkan campuran dengan natrium klorida P..." Jika hanya mengandung sedikit minyak atsiri dan hasil destilasi keruh, perlakuan dengan pelarut heksana P seperti di atas tidak dilakukan, destilat dapat dijemihkan dan dapat digunakan untuk penetapan bobot jenis dengan mengocok dengan heksana P lebih kurang seperlima bagian volume atau dengan penyaringan melalui lapisan tipis talk.

(2) Cara Kromatografi Gas-Cair

Alat kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kolom kaca 1,8 m X 4 mm berisi fase diam 53 dengan ukuran partikel 100 mesh hingga 120 mesh. Gunakan nitrogen P atau helium P sebagai gas pembawa. Sebelum digunakan kondisikan kolom semalam pada suhu 235°C alirkan gas pembawa dengan laju aliran lambat. Atur aliran gas pembawa dan suhu (lebih kurang 120°C) sehingga baku internal asetone nitril tereluasi dalam waktu 5 menit sampai 10 menit.

Larutan

Larutan baku I. Encerkan 5,0 ml etanol mutlak P dengan air hingga 250,0 ml.

Larutan baku internal. Encerkan 5,0 ml asetone nitril P dengan air hingga kadar etanol lebih kurang 2% v/v.

Larutan uji II. Pipet masing-masing 10 ml larutan uji I dan larutan baku internal ke dalam labu tentukur 100 ml, encerkan dengan air sampai tanda,

Larutan baku II. Pipet masing-masing 10 ml larutan baku I dan larutan baku internal ke dalam labu tentukur 100 ml, encerkan dengan air sampai tanda.

Prosedur. Suntikkan masing-masing 2 kali, lebih kurang 0,5 ml larutan uji II dan larutan baku II ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram

dan tetapkan perbandingan respons puncak. Hitung persentase etanol dalam contoh dengan rumus:

D adalah faktor pengenceran larutan uji I; Ru dan Rs berturut-turut adalah perbandingan respons puncak etanol dan asetoneitril dalam larutan uji II dan larutan baku II.

Uji kesesuaian sistem. Pada kromatogram yang sesuai, faktor resolusi, R, tidak kurang dari 2, dan simpangan baku relatif perbandingan respons puncak etanol dan baku internal pada enam kali penyuntikan ulang larutan baku II tidak lebih dari 4,0%. Faktor ikutan puncak etanol tidak lebih dari 1,5.

5.1.5 RESIDU PESTISIDA

PARAMETER SISA PESTISIDA

PENGERTIAN DAN PRINSIP Menentukan kandungan sisa pestisida yang mungkin saja pernah ditambahkan atau mengkontaminasi pada bahan simplisia pembuatan ekstrak.

TUJUAN Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung pestisida melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan.

NILAI Maksimal atau rentang yang diperbolehkan. Terkait dengan kontaminasi sisa pertanian

PROSEDUR

Berdasarkan besarnya frekuensi penggunaan pestisida di Indonesia dan persyaratan yang sering diminta oleh importir luar negeri terhadap ekspor bahan obat tradisional, maka metode analisis yang digunakan adalah untuk multiresidu pestisida organoklor dan organofosfat menurut Metode Pengujian Residu Pestisida Dalam Hasil Pertanian dari Komisi Pestisida Departemen Pertanian 1997 (Lampiran 4) dengan modifikasi sebagai berikut:

- (1) Jika kandungan kimia pengganggu analisis yang bersifat non polar relatif kecil seperti pada ekstrak yang diperoleh dengan penyari air atau etanol berkadar kurang dari 20%, analisis dapat dilakukan secara semi kuantitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis secara langsung tanpa melalui tahap pembersihan lebih dahulu atau menggunakan kromatografi gas jika tidak terdapat kandungan kimia dengan unsur N seperti klorofil, alkaloid dan amina non polar lain.
- (2) Ekstrak yang diperoleh dengan pelarut etanol berkadar tinggi dan tidak mengandung senyawa nitrogen non polar dapat dicoba menggunakan metode kromatografi lapis tipis atau kromatografi gas secara langsung tanpa pembersihan. Jika tidak dapat dilakukan karena banyaknya kandungan kimia pengganggu maka harus dilakukan pengujian sesuai metode baku. Agar memudahkan penelusuran kembali jika ada masalah analisis maka penomoran dan perincian terhadap analisis disesuaikan dengan buku aslinya.

5.1.6 CEMARAN LOGAM BERAT

PARAMETER CEMARAN LOGAM BERAT

PENGERTIAN DAN PRINSIP Menentukan kandungan logam berat secara spektroskopi serapan atom atau lainnya yang lebih valid.

TUJUAN Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Pb, Cd dll.) melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan.

NILAI Maksimal atau rentang yang diperbolehkan.

PROSEDUR

Pengujian ini dimaksudkan untuk menunjukkan bahwa cemaran logam yang dengan ion sulfida menghasilkan warna pada kondisi penetapan, tidak melebihi batas logam berat yang dipersyaratkan, dinyatakan dalam % (bobot) timbal dalam zat uji, ditetapkan dengan membandingkan secara visual seperti yang tertera pada perbandingan visual dalam *Spektrofotometri* dan *Hamburan Cahaya* dengan perbandingan *Larutan baku timbal*. Tetapkan jumlah logam berat menggunakan *Metode I*, kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi. *Metode I* digunakan untuk zat yang pada kondisi penetapan memberikan larutan jernih dan tidak berwarna. *Metode III* digunakan untuk zat...yang pada kondisi *Metode I* tidak menghasilkan larutan jernih dan tidak berwarna, atau untuk zat yang karena sifat alam yang kompleks, mengganggu pengendapan logam oleh ion sulfida, atau untuk minyak digesti basah, hanya digunakan bila *Metode I* dan *Metode III* tidak dapat digunakan.

Pereaksi khusus

Larutan persediaan timbal (II) nitrat. Larutkan 159,8 timbal (II) nitrat P dalam

100 ml air yang telah ditambah 1 ml asam nitrat P, kemudian encerkan dengan air hingga 1000 ml. Buat dan simpan larutan ini dalam wadah kaca yang bebas dari garam-garam timbal yang larut.

Larutan baku timbal. Buat larutan segar dengan mengencerkan, 10,0 ml *Larutan persediaan timbal (II) nitrat* dengan air hingga 100 ml. Tiap ml *Larutan baku timbal* setara dengan 10 mg timbal. *Larutan perbandingan* yang dibuat dari 100 ml *Larutan baku timbal* dalam 1 g zat uji setara dengan 1 bagian timbal persepuluhan.

Metode I

Larutan baku. Pipet 2 ml *Larutan baku timbal* ($20 \mu\text{g Pb}$) ke dalam tabung perbandingan warna 50 ml dan encerkan dengan air hingga 25 ml. Atur pH antara 3,0 dan 4,0 dengan asam asetat 1 N atau amoniun hidroksida 6 N

menggunakan indikator kertas pH pendek sebagai indikator eksternal, encerkan dengan air hingga 40 ml, campur.

Larutan uji. Ke dalam tabung pembandingan 50 ml masukkan 25 ml larutan

uji, atau larutkan dan encerkan dengan air hingga 25 ml sejumlah zat uji dalam g yang dihitung dengan rumus :

$$\frac{2,0}{1000 L}$$

L adalah batas Logam berat dalam persen. Atur pH antara 3,0 dan 4,0 dengan asam asetat 1 N atau amonium hidroksida 6 N menggunakan kertas indikator pH rentang pendek sebagai indikator eksternal, encerkan dengan air hingga 40 ml, campur.

Larutan monitor. Masukkan 25 ml larutan yang dibuat sama seperti *Larutan*

uji ke dalam tabung pembanding warna 50 ml, dan tambahkan 2,0 ml *Larutan baku timbal*. Atur pH antara 3,0 dan 4,0 dengan asam asetat 1 N atau amonium hidroksida 6 N menggunakan kertas indikator pH rentang pendek sebagai indikator eksternal, encerkan dengan air hingga 40 ml, campur.

Prosedur:

Ke dalam tiap tabung dari 3 tabung yang masing-masing berisi *Larutan baku*, *Larutan uji* dan *Larutan* monitortambahkan 10 ml hidrogen sulfida LP yang dibuat segar, campur, diamkan selama 5 menit. Amati permukaan dari atas pada dasar putih: warna yang terjadi pada *Larutan uji* tidak lebih gelap dari warna yang terjadi pada *Larutan baku*, dan intensitas warna pada *Larutan monitor* sama atau lebih kuat dari *Larutan baku*.

(Catatan Bila warns pada Larutan monitor /ebih muda dari warna Larutan baku, gunakan Metode III sebagai ganti Metode I untuk zat uji.)

Metode II

Larutan baku timbal 2 bpj. Pipet 20 ml *Larutan baku timbal* (200 µg, Pb), encerkan dengan air hingga 100 ml.

Larutan baku timbal 1 bpj Pipet 10 ml *Larutan baku timbal* (100 µg Pb), encerkan dengan air hingga 100 ml.

Larutan uji. Lakukan seperti pada Metode I.

Prosedur:

Pada 12 ml *Larutan uji* tambahkan 2 ml dapar asetat pH 3,5, campur. tambahkan 1,2 ml tioasetamida LP dan diamkan selama 2 menit. Warna coklat yang terjadi tidak lebih intensif dari campuran 10 ml *Larutan baku timbal* 1 bpj atau *Larutan baku timbal* 2 bpj dan 2 ml *Larutan uji* yang diperlakukan sama.

Metode III

Larutan beku. Buat seperti yang tertera pada Metode I.

Larutan uji. Gunakan sejumlah zat uji, dalam g, yang dihitung dengan rumus :

2,0
1000 L

L adalah batas Logam berat dalam persen. Masukkan sejumlah zat yang telah ditimbang ke dalam krus yang membasahi, dan pijarkan hati-hati pada

suhu rendah hingga mengarang. Selama pemijaran krus tidak boleh ditutup rapat. Pada bagian yang telah mengarang tambahkan 2 ml asam nitrat P dan 5 tetes asam sulfat P, panaskan hati-hati hingga asap putih tidak terbentuk lagi. Pijarkan, lebih baik dalam tanur, pada suhu 500°C hingga

600°C sampai arang habis terbakar. Dinginkan, tambahkan 4 ml asam klorida

6 N, tutup, digesti di atas tangas uap selama 15 menit, buka dan uapkan perlahan-lahan di atas tangas uap hingga kering. Basahkan sisa dengan satu tetes asam klorida P, tambah 10 ml air panas, dan digesti selama 2 menit. Tambahkan amonium hidroksida 6 N tetes demi tetes, hingga larutan bereaksi basa terhadap kertas lakmus, encerkan dengan air hingga 25 ml, dan atur pH antara 3,0 dan 4,0 dengan asam asetat 1 N, menggunakan kertas indikator pH rentang pendek sebagai indikator eksternal. Saring jika perlu, bilas krus dan penyaring dengan 10 ml air. Kumpulkan filtrat dan air cucian dalam tabung pembanding warna 50 ml, encerkan dengan air hingga

40 ml, campur.

Prosedur:

Ke dalam tiap tabung yang masing-masing berisi Larutan baku dan Larutan uji, tambahkan 10 ml hidrogen sulfida LP yang dibuat segar, campur, diamkan selama 5 menit dan amati permukaan dari atas pada dasar putih; warna yang terjadi pada Larutan uji tidak lebih gelap dari Larutan baku.

Metode IV

Masukkan sejumlah ekstrak (tidak lebih dari 2 g) ke dalam krus silika dan 4 ml larutan magnesium sulfat P 25% dalam asam sulfat 2 N. Aduk dengan batang pengaduk kaca kecil dan panaskan hati-hati. Jika campuran berbentuk cairan, uapkan perlahan-lahan pada suhu tidak lebih dari 800°C, dan lanjutkan pemanasan liir, gga sisa berwarna putih atau keabu-abuan. Biarkan dingin, basahkan sisa dengan 0,2 ml asam sulfat 2 N uapkan, pijarkan kembali dan biarkan dingin. ;_arr,a pemijaran tidak boleh lebih dari

2 jam. Larutkan sisa dalam 5 ml asam klorida 2 N tambahkan lagi 5 ml asam klorida 2 N. Tambahkan 0, 1 ml fenv1f..~1ein LP dan amonium hidroksida 13

N tetes demi tetes hingga berwarna merah muda. Dinginkan, tambahkan asam asetat glasial P hingga larutan tidak berwarna, dan tambahkan lagi 0,5 ml. Saring jika perlu dan encerkan larutan dengan air hingga 20 ml.

Ke dalam 12 ml larutan di atas, tambahkan 2 ml dapar asetat pH 3,5 campur, tambahkan 1-2 ml sebaiknya dengan lempeng pemanas pada suhu tidak lebih dari 120°C sampai mulai pengarang Oika diperlukan penambahan asam sulfat P untuk membasahi spesimen secara sempurna, tambahkan hati-hati melalui kondensor, tetapi jumlahnya tidak boleh lebih dari 10 ml). Setelah zat uji terurai oleh asam, tambahkan hati-hati melalui pendingin, tetes demi tetes *hidrogen peroksida P*, biarkan

reaksi reda dan panaskan lagi diantara penetesan (tambahkan beberapa tetes pertama dengan sangat hati-hati dengan pencampuran yang cukup, untuk mencegah reaksi yang cepat; hentikan pemanasan jika terjadi buih berlebihan). Jika reaksi telah reda, panaskan hati-hati, goyang labu sesekali untuk mencegah zat melekat pada dinding dasar labu yang kontak dengan pemanas. Pertahankan kondisi

oksidasi selama digesti dengan penambahan sedikit hidrogen peroksida apabila campuran menjadi coklat atau hitam. Lanjutkan digesti sampai zat organik terurai, dan kemudian refluks campuran selama 1 jam. Hentikan sirkulasi air pendingin, dan panaskan hingga terjadi asap putih belerang trioksida berlebihan dan larutan menjadi tidak berwarna atau sedikit kekuningan. Dinginkan, dan tambahkan 10 ml air hati-hati melalui kondensor, sambil menggoyangkan labu. Panaskan kembali hingga terjadi uap putih. Dinginkan, tambahkan 15 ml air hati-hati. Lepaskan pendingin, bilas dinding labu sebelah dalam dengan beberapa ml air hingga diperoleh volume 35 ml. Tambahkan 1 ml Larutan *kalium permanganat*, dididihkan selama beberapa detik, dan dinginkan.

Prosedur:

Lakukan seperti yang tertera pada *Prosedur* dalam *Metode II*.

5.1.7 CEMARAN MIKROBA

PARAMETER CEMARAN MIKROBA

PENGETERIAN	Menentukan (identifikasi) adanya mikroba yang patogen
DAN PRINSIP	secara analisis mikrobiologis
TUJUAN	Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan tidak mengandung mikroba non patogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya (toksik) bagi kesehatan.
NILAI	Maksimal atau rentang yang diperbolehkan.

PROSEDUR

(1) Uji Angka Lempeng Total

Pengertian dan prinsip

Pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai.

Media Dan Perekasi

Media

Plate Count Agar (PCA)

Perekasi

Pepton Dilution Fluid (PDF)

Fluid Casein Digest Soy Lecithin Polysorbate (FCDSLIP)

Minyak mineral (Parafin cair)

Tween 80 dan 20.

Peralatan Khusus

Stomacher atau blender

Alat hitung koloni.

Prosedur

Disiapkan 5 buah tabung atau lebih yang masing-masing telah diisi dengan

9 ml pengencer PDF. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 ml ke dalam tabung yang berisi pengencer PDF pertama hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan dikocok hingga homogen. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-6} atau sesuai dengan yang diperlukan. Dari setiap pengenceran dipipet 1 ml ke dalam cawan petri dan dibuat duplo. Ke dalam tiap cawan petri dituangkan 15-20 ml media PCA

($45 \pm 1^\circ$). Segera cawan petri digoyang dan diputar sedemikian rupa hingga

suspensi tersebar merata. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer dibuat uji kontrol (blangko). Pada satu cawan hanya diisi 1 ml pengencer dan media agar, dan pada cawan yang lain diisi pengencer dan media. Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu $35-37^\circ\text{C}$ selama 24-48 jam dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

Perhitungan

Dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 30-300. Jumlah koloni rata-rata dari kedua cawan dihitung lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Hasil dinyatakan sebagai Angka Lempeng Total dalam tiap gram contoh. Bila ditemui jumlah koloni kurang dari 30 atau lebih dari 300, maka diikuti petunjuk sebagai berikut :

- (1) Bila hanya salah satu di antara kedua cawan yang menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, dihitung rata-rata dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- (2) Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan faktor pengenceran kemudian diambil angka rata-rata. Jika pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapati jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni yang seharusnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (misal pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 140 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 32 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada tingkat pengenceran 10^{-2}).
- (3) Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 30-300 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Lempeng Total Perkiraan
- (4) Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Lempeng Total dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.
- (5) Bila jumlah koloni per cawan lebih dari 3000, maka cawan dengan tingkat

pengenceran tertinggi dibagi dalam beberapa sektor (2, 4 atau 8). Jumlah koloni dikalikan dengan faktor pembagi dan faktor pengencerannya, hasil dilaporkan sebagai Angka Lempeng Total Perkiraan.

- (6) Bila jumlah koloni lebih dari 200 pada $\frac{1}{8}$ bagian cawan, maka jumlah koloni adalah $200 \times 8 \times$ faktor pengenceran. Angka Lempeng Total Perkiraan dihitung sebagai lebih besar dari jumlah koloni yang diperoleh.

(2) Uji Nilai Duga Terdekat (MPN) ColHorm.

Pengertian dan prinsip

Pertumbuhan bakteri coliform setelah cuplikan diinokulasikan pada media cair yang sesuai, adanya reaksi fermentasi dan pembentukan gas di dalam tabung Durham.

Pereaksi Khusus

Pepton Dilution Fluid (PDF)

Mac Conkey Broth (MCB)

Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)

Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)

Violet Red Bille Agar (VRBA)

Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) Medium

Trypton Broth

Simmon's Citrate Agar

Nutrient Agar

Peralatan Khusus

Stomacher atau Blender atau Cawan Mortir

Pipet ukur

Tabung Durham.

Prosedur

Disiapkan 5 tabung reaksi masing-masing berisi 9 ml PDF. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet 1 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung PDF pertama hingga diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-2} dan dikocok sampai homogen. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-6} .

Uji Prakiraan

Untuk setiap pengenceran disiapkan 3 tabung berisi 9 ml MCB yang dilengkapi tabung Durham. Ke dalam tiap tabung dari masing-masing seri dimasukkan 1 ml suspensi pengenceran. Diinkubasi pada suhu 37°C selama

24-48 jam. Setelah 24 jam dicatat dan diamati adanya gas yang terbentuk di dalam tiap tabung. Kemudian inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam dan dicatat tabung-tabung yang menunjukkan gas positif.

Uji konfirmasi

Biakan dari tabung yang menunjukkan uji prakiraan positif dipindahkan 1 sengkelit ke dalam tabung berisi 10 ml BGLB yang telah dilengkapi tabung Durham. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Dilakukan pengamatan terhadap pembentukan gas.

Jumlah tabung yang positif gas dicatat dan hasil pengamatan tersebut dirujuk ke tabel Nilai Duga Terdekat (NDT)/Minimal Presumptif Number

(MPN). Angka yang diperoleh pada tabel MPN menyatakan jumlah bakteri coliform dalam tiap gram contoh yang diuji.

Tabel : MPN (cara 3 tabung). Indeks MPN dan batas kepercayaan 95% limits bila digunakan tiga tabung

			MPN		
1 : 10	1 : 100	1 : 1000		Bawah	Atas
	0	0	<3		
	0	1	3	< 0,5	
	1	0	3	< 0,5	
	0	0	4	< 0,5	
	0	1	7	1	
	1	0	7	1	
	1	1	11	3	
	2	0	11	3	
	0	0	9	1	
	0	1	14	3	
1	1	0	15	3	
2	1	1	20	7	
	2	0	21	4	
	2	1	28	10	
	0	0	23	4	
	0	1	39	7	
	0	2	64	15	
	1	0	43	7	
	1	1	75	14	
	1	2	120	30	
	2	0	93	15	
	2	1	150	30	
	2	2	210	35	
	3	0	240	36	
	3	1	460	71	
	3	2	1.100	150	
	3	3	>2400		

PARAMETER CEMARAN KAPANG, KHAMIR DAN AFLATOKSIN

PENGERTIAN DAN PRINSIP	Menentukan adanya jamur secara mikrobiologis dan adanya aflatoksin dengan KLT.
TUJUAN	Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan.
NILAI	Maksimal atau rentang yang diperbolehkan

PROSEDUR

(3) Uji Angka Kapang dan Khamir

Pengertian dan prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir setelah cuplikan diinokulasikan pada media yang sesuai dan diinkubasikan pada suhu 20-25°C.

Pereaksi/Media Khusus

Media

Potato Dextrose Agar (PDA) atau
 Czapek Dox Agar (CDA) atau
 Malt Agar
 Air Suling Agar 0,05% (ASA)
 Kloramfenikol 100 mg/liter media.

Peralatan Khusus

Lemari aseptik
 Stomacher atau blender
 Pipet ukur mulut lebar

Prosedur

Disiapkan 3 buah tabung yang masing-masing telah diisi 9 ml ASA. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet 1 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung ASA pertama hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan dikocok sampai homogen. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-4} . Dari masing-masing pengenceran dipipet 0,5 ml, dituangkan pada permukaan PDA, segera digoyang sambil diputar agar suspensi tersebar merata dan dibuat duplo. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer, dilakukan uji blangko. Ke dalam satu cawan petri dituangkan media dan dibiarkan memadat. Ke dalam cawan petri lainnya dituangkan media dan pengencer, kemudian dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 5-7 hari. Sesudah 5 hari inkubasi, dicatat jumlah koloni jamur yang tumbuh, pengamatan terakhir pada inkubasi 7 hari. Koloni ragi dibedakan karena bentuknya bulat kecil-kecil putih hampir menyerupai bakteri. Lempeng Agar yang diamati adalah lempeng dimana terdapat 40 - 60 koloni Kapang/Khamir.

Perhitungan

Misalkan pada pengenceran 10^{-4} terdapat sebanyak 40 koloni, maka angka kapang/khamir (bila terdapat) adalah $40 \times 10^4 = 40.10^4$ koloni per gram contoh. Contoh, untuk beberapa kemungkinan lain yang berbeda dari pernyataan di atas, maka diikuti petunjuk sebagai berikut:

- (1) Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang sama menunjukkan jumlah antara 40-60 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan dengan faktor pengenceran.
- (2) Bila pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran di bawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah (misal pada pengenceran 10^{-2} diperoleh 60 koloni dan pada pengenceran 10^{-3} diperoleh 20 koloni, maka dipilih jumlah koloni pada tingkat pengenceran 10^{-2} yaitu 60 koloni).
- (3) Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 40-60 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Kapang/Khamir perkiraan.
- (4) Bila tidak ada pertumuhan pada semua cawan dan bukan disebabkan karena faktor inhibitor, maka Angka Kapang/Khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah.

(4) Uji Cemaran Aflatoksin.

Pengertian dan prinsip

Pemisahan isolat aflatoksin secara Kromatografi Lapis Tipis.

Pereaksi khusus.

Media dan pengenceran Media Yeast Extract Sucrose Broth (YES).

Peralatan khusus.

Lemari aseptik
Lampu Ultra violet
Mikropipet 10 ml

Prosedur

Kultur *Aspergillus flavus* hasil isolat dan identifikasi dari ekstrak diinokulasikan pada permukaan media YES. Tabung diinokulasi pada suhu 25°C selama satu minggu dalam posisi miring untuk mendapatkan permukaan yang luas. Biakan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, biakan dibiarkan sampai dingin. Sejumlah kecil media biakan diambil dengan menggunakan pipet pasteur dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil atau vial.

Identifikasi

Kromatografi Lapis Tipis

Thadap media biakan, ekstrak yang diuji dan Baku Aflatoksin dilakukan Kromatografi Lapis Tipis sebagai berikut:

Lempeng	Silika gel (Lempeng pralapis) Kiesel gel 60, Merck.
Baku Aflatoksin	Merupakan campuran siap pakai terdiri dari 5,0 ug Aflatoksin 81; 1,5 ug Aflatoksin 82; 5,0 ug Aflatoksin G ₁ ; 1,5 ug Aflatoksin G ₂ dalam larutan campuran benzene : acetonitril (98 : 2) (Sigma Chemical Com• pany).
Eluen	Campuran kloroform : aseton : n-heksan (85 : 15 : 20)
Jarak rambat	10cm.
Penampak bercak	Bercak berwarna biru atau hijau kebiruan setelah lempeng diletakkan dibawah cahaya ultraviolet (366 nm), menandakan aflatoksin positif.

5.2. PARAMETER SPESIFIK

5.2.1 IDENTITAS

PARAMETER IDENTITAS EKSTRAK :

PENGERTIAN DAN PRINSIP

- I. Deskripsi tata nama :
 1. Nama ekstrak (generik, dagang, paten)
 2. Nama latin tumbuhan (sistematika botani)
 3. Bagian tumbuhan yang digunakan (rimpang, daun dsb.)
 4. Nama Indonesia tumbuhan.
- II. Ekstrak dapat mempunyai senyawa identitas. artinya senyawa tertentu yang menjadi petunjuk spesifik dengan metode tertentu.

TUJUAN

Memberikan identitas obyektif dari nama dan spesifik dari senyawa identitas.

CONTOH

- I. Deskripsi tata nama :
 1. *Curcumae Extractum* (ekstrak Temulawak))
 2. *Curcuma xanthorrhiza Roxb.*
 3. *Curcumae Rhizoma*
 4. Temu Lawak (Indonesia)
- II. Senyawa identitas adalah Xanthorrhizol

5.2.2 ORGANOLEPTIK

PARAMETER ORGANOLEPTIK EKSTRAK :

PENGERTIAN DAN PRINSIP	Penggunaan pancaindra mendiskripsikan bentuk, warna, bau, rasa sebagai berikut : <ol style="list-style-type: none"> 1. Bentuk padat, serbuk-kering, kental, cair. 2. Wama kuning, coklat, dll. 3. Bau aromatik, tidak berbau, dll. 4. Rasa pahit, manis, kelat, dll.
TUJUAN	Pengenalan awal yang sederhana seobyektif mungkin
CONTOH	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bentuk Serbuk kering 2. Warna kuning kemerahan 3. Bau aromatik 4. Rasa pahit

5.2.3 SENYAWA TERLARUT DALAM PELARUT TERTENTU

PARAMETER SENYAWA TERLARUT DALAM PELARUT TERTENTU

PENGERTIAN DAN PRINSIP	Melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa terlarut dalam pelarut lain misalnya heksana, diklorometan. metanol.
TUJUAN	Memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan.
NILAI	Nilai minimal atau rentang yang ditetapkan terlebih dahulu

PROSEDUR

- (1) Kadar senyawa yang larut dalam air.
Maserasi sejumlah 5,0 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml air kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal.
- (2) Kadar senyawa yang larut dalam etanol.

Maserasi sejumlah 5,0 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml etanol (95%), menggunakan labu bersumbat sambil berkali-

kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindari penguapan etanol, kemudian uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal.

5.3. UJI KANDUNGAN KIMIA EKSTRAK

5.3.1 POLA KROMATOGRAM

PARAMETER POLA KROMATOGRAM

PENGERTIAN DAN PRINSIP Ekstrak ditimbang, diekstraksi dengan pelarut dan cara tertentu, kemudian dilakukan analisis kromatografi sehingga memberikan pola kromatogram yang khas.

TUJUAN Memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan pola kromatogram (KLT, KCKT, KG).

NILAI Kesamaan pola dengan data baku yang ditetapkan terlebih dahulu

PROSEDUR

Penyiapan larutan uji :

Ekstrak ditimbang dan diekstraksi berturut-turut dengan pelarut hexane, etilasetat, etanol, air. Cara ekstraksi dapat dilakukan dengan pengocokan selama 15 menit atau dengan getaran ultrasonik atau dengan pemanasan kemudian disaring untuk mendapatkan larutan uji.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT = TLC) :

Umumnya dibuat kromatogram pada lempeng silika gel dengan berbagai jenis fase gerak sesuai dengan golongan kandungan kimia sebagai sasaran analisis. Evaluasi dapat dilakukan dengan dokumentasi foto hasil pewarnaan lempeng kromatografi dengan pereaksi yang sesuai atau dengan melihat kromatogram hasil perekaman menggunakan instrumen densitometer (TLC-Scanner). Perekaman dapat dilakukan secara absorpsi-refleksi pada panjang gelombang 254 nm, 365 nm dan

415 nm atau pada panjang gelombang lain yang spesifik untuk suatu komponen yang telah diketahui.

Kromatografi Gas (KG = GC) :

Sistem kromatografi gas mempunyai resolusi tinggi sehingga optimal untuk pemisahan komponen yang stabil dengan pemanasan.

Umumnya dibuat profil kandungan minyak atsiri atau metabolit sekunder tertentu lainnya seperti jenis fitosterol. Jenis kolom umumnya ada 3 jenis sesuai dengan urutan kepolaritasannya, yaitu OV-1, OV-% dan Carbowax 20M. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan program temperatur, dari temperatur rendah sampai temperatur maksimal kolom. Detektor yang digunakan umumnya hanya FID karena metabolit sekunder tumbuhan umumnya senyawa organik hidrokarbon.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT = HPLC) :

Umumnya pola kromatogram kandungan kimia yang termolabil dibuat dengan HPLC. Kemampuannya tergantung pada jenis kolom, fase gerak dan detektor. Kolom umumnya digunakan jenis ODS (RP18). Eluasi dilakukan dengan program gradien linear. Deteksi dengan spektrofotometer monokromatis dilakukan pada panjang gelombang 210 nm, 254 nm, 300 nm dan 365 nm. Deteksi secara spektrofлуoresensi digunakan jika dibutuhkan pola kromatogram yang selektif dan khusus pada golongan kandungan kimia.

5.3.2 KADAR TOTAL GOLONGAN KANDUNGAN KIMIA

PARAMETER KADAR TOTAL GOLONGAN KANDUNGAN KIMIA PENGERTIAN DAN PRINSIP	Dengan penerapan metode spektrofotometri, titrimetri, volumetri, gravimetri atau lainnya, dapat ditetapkan kadar golongan kandungan kimia. Metode harus sudah teruji validitasnya, terutama selektivitas dan batas linearitas. Ada beberapa golongan kandungan kimia yang dapat dikembangkan dan ditetapkan metodenya, yaitu :
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Golongan minyak atsiri. 2. Golongan steroid 3. Golongan tanin 4. Golongan flavonoid. 5. Golongan triterpenoid (saponin) 7. Golongan alkaloid 8. Golongan antrakinon.
TUJUAN	Memberikan informasi kadar golongan kandungan kimia sebagai parameter mutu ekstrak dalam kaitannya dengan efek farmakologis.
NILAI	Minimal atau rentang yang telah ditetapkan.

PROSEDUR

(1) Penetapan kadar minyak atsiri

Letakkan labu alas bulat 1 liter, berleher pendek dalam mantel pemanas yang dilengkapi dengan pengaduk magnetik. Masukkan batang pengaduk magnetik ke dalam labu, hubungkan labu dengan pendingin dan alat penampung berskala seperti pada gambar.

Timbang secukupnya sejumlah ekstrak hingga diperkirakan dapat menghasilkan 1 ml sampai 3 ml minyak atsiri. Masukkan sejumlah ekstrak yang telah ditimbang seksama ke dalam labu. Hubungkan dengan bagian pendingin dan penampung berskala. Didihkan isi labu dengan pemanasan yang sesuai untuk menjaga agar pendidihan berlangsung tidak terlalu kuat selama 2 jam atau sampai minyak atsiri terdestilasi sempurna dan tidak bertambah lagi dalam bagian penampung berskala

Jika sejumlah volume minyak atsiri telah tertampung dalam bagian penampung berskala, pencatatan dapat dilakukan dengan pembacaan sampai 0,1 ml, dan volume minyak atsiri untuk setiap 100 g ekstrak dapat dihitung dari bobot ekstrak yang ditimbang. Skala pada penampung untuk minyak atsiri dengan bobot jenis lebih besar dari air diletakkan sedemikian hingga minyak atsiri tertampung di bawah kondensat air, sehingga otomatis air kembali ke dalam labu.

(2) Penetapan kadar steroid

Larutan baku: timbang seksama 1 mg sitosterol, larutkan dalam etanol P secara bertingkat sehingga diperoleh kadar 5 μg per ml, 10 μg per ml dan 20 μg per ml.

Larutan uji : timbang seksama 1 g ekstrak, larutkan dalam 20 ml etanol dalam labu takar. Ulangi tiga kali dengan cara yang sama. Ke dalam dua labu yang masing-masing berisi larutan uji dan larutan baku dan ke dalam labu ketiga yang berisi 200 ml etanol P sebagai blangko, tambahkan 2,0 ml larutan yang dibuat dengan melarutkan 50 mg biru tetrazolium P dalam 10 ml metanol P, dan campur. Kemudian ke dalam tiap labu tambahkan

2,0 ml campuran etanol P dan tetrametil amonium hidroksida LP (9: 1), campur, dan biarkan dalam gelap selama 90 menit. Ukur segera serapan larutan yang diperoleh dari larutan uji dan larutan baku pada panjang gelombang lebih kurang 525 nm dibandingkan terhadap blangko.

(3) Penetapan kadar tanin

Lebih kurang 2 g ekstrak yang ditimbang seksama panaskan dengan 50 ml air mendidih di atas tangas air selama 30 menit sambil diaduk. Diamkan selama beberapa menit enap

tuangkan melalui segumpal kapas ke dalam labu takar 250 ml. Sari sisa

dengan air mendidih, saring larutan ke dalam labu takar yang sama. Ulangi penyarian beberapa kali hingga larutan bila direaksikan dengan besi (III) amonium sulfat tidak menunjukkan adanya tanin. Dinginkan cairan dan tambahkan air secukupnya hingga 250 ml. Pipet 25 ml larutan ke dalam labu 1000 ml tambahkan 750 ml air dan 25 ml asam indigo sulfonat LP, titrasi dengan kalium permanganat 0,1 N hingga larutan berwarna kuning emas. 1 ml kalium permanganat 0,1 N setara dengan 0,004157 g tanin. Lakukan percobaan blangko.

Asam indigosulfonatLP

Larutkan 1 g indigo karmin P dalam 25 ml asam sulfat P, tambahkan 25 ml asam sulfat P lagi dan encerkan dengan air secukupnya hingga 1.000 ml. (Pengeceran dilakukan dengan menuangkan larutan ke dalam sebagian besar air, kemudian encerkan dengan air secukupnya hingga 1.000 ml)

(4) Penetapan kadar flavonoid

Prinsipmetode :

Flavonoid ditetapkan kadarnya sebagai aglikon dengan terlebih dahulu dilakukan hidrolisis dan selanjutnya dilakukan pengukuran spektrometri dengan mereaksikan $AlCl_3$ yang selektif dengan penambahan Heksametilentetramina pada panjang gelombang maksimum

Cara kerja hidrolisis:

Timbang tepat ekstrak yang setara 200 mg simplisia dan masukkan ke dalam labu alas bulat. Tambahkansistem hidrolisis, yaitu 1,0 ml larutan 0,5% b/v heksametilentetramina, 20,0 ml aseton dan 2,0 ml larutan 25% HCl dalam air. Lakukan hidrolisis dengan pemanasan sampai mendidih (gunakan pendingin air/ "reflux") selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring menggunakan kapas ke dalam labu ukur 100,0 ml. Residu hidrolisis ditambah 20 ml aseton untuk dididihkan kembali sebentar, lakukan dua kali dan filtrat dikumpulkan semua ke dalam labu ukur. Setelah labu ukur dingin, maka volume ditepatkan sampai tepat 100,0 ml, kocok rata. 20 ml filtrat hidrolisa dimasukkan corong pisah dan tambahkan 20 ml Hp. selanjutnya lakukan ekstraksi kocok, pertama dengan 15 ml etilasetat. Kemudian 2 kali dengan 10 ml etilasetat. dan kumpulkan fraksi etilasetat kedalam labu ukur 50,0 ml, akhirnya tambahkan etilasetat sampai tepat 50,0 ml. Untuk replikasi spektrometri lakukan prosedur ini 3 - 4 kali.

Cara kerja spektrometri :

Masukkan 10 ml larutan fraksi etilasetat (hidrolisa) ke dalam labu ukur 250 ml, tambahkan 1 ml larutan 2 g AlCl_3 dalam 100 ml larutan asam asetat glacial 5% v/v (dalam metanol). Tambahkan secukupnya larutan asam asetat glacial 5% v/v (dalam metanol) secukupnya sampai tepat 250 ml. Hasil reaksi siap diukur pada spektrofotometer setelah 30 menit berikutnya pada panjang gelombang maksimum. Perhitungan kadar menggunakan bahan standar glikosida flavonoid (Hiperoksida, rutin, hesperidin) gunakan kurva baku dan nilai kadar terhitung sebagai bahan standar tersebut. Kalau menggunakan hiperoksida dapat langsung diukur dengan rumus :

$$\text{Kadar total flavonoid} = \left[(A_0 \times 1,25) \text{ berat sampel} \right] \%$$

(5) Penetapan kadar saponin.

Hemolisa.

Larutan dapar fosfat pH 7,4. Larutan 16,0 g natrium fosfat P yang telah dikeringkan pada suhu 130°C hingga bobot tetap dan

4,4 g natrium dihidrogen fosfat P dalam 1000 ml air. Untuk menambah stabilitas tambahkan 0,1 g natrium fluorida P.

Suspensi darah. Masukkan 10 ml natrium sulfat 3,65% b/v ke dalam labu takar bersumbat kaca 100 ml. Tambahkan darah sapi segar secukupnya hingga 100 ml, campur baik-baik hingga homogen (larutan stabil selama 7 hari jika disimpan dalam lemari pendingin).

Pipet 2 ml larutan di atas ke dalam labu takar yang besumbat kaca 100 ml, tambahkan larutan dapar fosfat pH 7,4 secukupnya hingga 100 ml, campur baik-baik. Larutan dapat dipergunakan jika larutan jernih dan jika terjadi endapan. endapan tidak berwarna ungu.

Cara percobaan. Campur 0,5 g ekstrak yang diperiksa dengan 50 ml larutan dapar fosfat pH 7,4, panaskan sebentar. dinginkan, saring. Ambit 1 ml filtrat, campur dengan 1 ml suspensi darah. Untuk ekstrak yang mengandung tanin encerkan 0,2 ml filtrat dengan 0,8 ml larutan dapar fosfat pH 7,4, campur dengan 1 ml suspensi darah. Diamkan selama 30 menit, terjadi haemolisa total, menunjukkan adanya saponin. Kadar saponin dalam ekstrak dapat ditetapkan dengan melakukan berbagai pengenceran filtrat dan diamati kadar yang masih menghasilkan haemolisa total, dibandingkan dengan saponin pembanding.

(6) Penetapan kadar alkaloid.

Timbang seksama 1 gram ekstrak, masukkan dalam corong

pisah 125 ml pertama, kemudian tambahkan 20 ml larutan asam sulfat P (1 dalam 350) dan kocok kuat selama 5 menit. Tambahkan 20 ml eter P, kocok hati-hati, saring lapisan asam ke dalam corong pisah 125 ml kedua. Koeck lapisan eter dua kali, tiap kali dengan 10 ml larutan asam sulfat P (1 dalam 350), saring tiap lapisan asam ke dalam corong pisah 125 ml kedua dan buang lapisan eter. Pada ekstrak asam tambahkan 10 ml natrium hidroksida LP dan 50 ml eter P, kocok hati-hati, pindahkan lapisan air ke dalam corong pisah 125 ml ketiga berisi 50 ml eter P. Kocok corong pisah ketiga hati-hati, buang lapisan air, cuci lapisan eter pada corong pisah kedua dan ketiga berturut-turut dengan 20 ml air, buang lapisan air. Ekstraksi kedua lapisan eter masing-masing dengan 20 ml, 20ml dan 5 ml larutan asam sulfat P (1 dalam 70). Lakukan ekstraksi pada corong pisah ketiga lebih dahulu, setelah itu corong pisah kedua. Campur ekstrak asam dalam labu tentukur 50 ml, encerkan dengan asam sampai tanda. Lakukan hal yang sama terhadap 25 mg alkaloid pembanding yang tersedia. Encerkan masing-masing 5,0 ml larutan uji dan larutan pembanding dengan larutan asam sulfat P (1 dalam 70) hingga 100,0 ml dantetapkan serapan tiap larutan pada panjang gelombang tertentu menggunakan larutan asam sulfat P (1 dalam 70) sebagai blangko.

(7) Penetapan kadar antrakinin

Timbang 0.1 g ekstrak kocok, dengan 10 ml air panas selama 5 menit, saring dalam keadaan panas, dinginkan filtrat, dan ekstraksi dengan 10 ml benzena. Pisahkan lapisan benzena. Tambahkan pada lapisan air 10 ml larutan feri klorida 5% dan 5 ml asam klorida. Panaskan campuran pada penangas air selama 10 menit dalam tabung refluks. Dinginkan dan ekstraksi dengan 10 ml benzena. Uapkan cairan hingga habis pada cawan porselen dengan pemanasan lemah. Larutkan residu dalam 5 ml larutan kalium hidroksida 5% dalam metanol. Ukur resapan pada 515 nm. Hitung kadar total antrakininon glikosida berdasarkan kurva baku antrakininon pembanding.

5.3.3 KADAR KANDUNGAN KIMIA TERTENTU

PARAMETER KADAR KANDUNGAN KIMIA TERTENTU

PENGERTIAN Dengan tersedianya suatu kandungan kimia
DAN PRINSIP yang berupa senyawa identitas atau senyawa kimia utama ataupun kandungan kimia lainnya, maka secara kromatografi instrumen•

tal dapat dilakukan penetapan kadar kandungan kimia tersebut. Instrumen yang dapat digunakan adalah Densitometer, Kromatografi Gas, Kromatografi Cair Kinerja

Tinggi atau instrumen lain yang sesuai. Metode penetapan kadar harus diuji dahulu validitasnya, yaitu batas deteksi, selektivitas, linearitas, ketelitian, ketepatan dan lain-lain.

TUJUAN

Memberikan data kadar kandungan kimia tertentu sebagai senyawa identitas atau senyawa yang diduga bertanggung jawab pada efek farmakologi. Contoh adalah penetapan kadar andrografolid dalam ekstrak sambiloto secara HPLC atau penetapan kadar pinostrobin dalam ekstrak temu kunci secara densitometri.

NILAI

Minimal atau rentang kadar yang telah ditetapkan.

PROSEDUR

Kadar kandungan kimia aktif/utama/identitas
Spesifik untuk masing-masing ekstrak yang distandardisasi.

BABVI

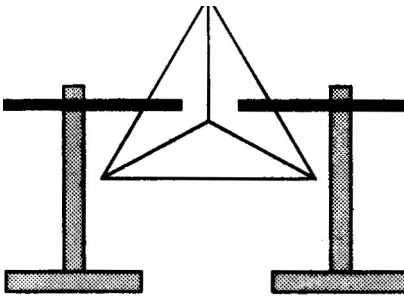
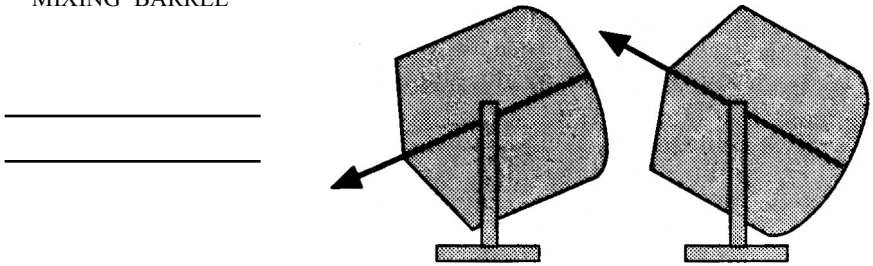
DAFTAR PUSTAKA

1. Artiges, A. 1991. What are legal requirements for the use of phytopharmaceutical drugs in France?. *J. of Ethnopharmacology*. 32: 231-234.
2. Bauer, R., Cygan, F.Ch., Franz, G., Ihrig, M., Nahrstedt, A., Sprecher, E. 1994. Pharmazeutische Qualitaet, Standardisierung und Normierung von Phytopharmaka, Zeitschrift fuer Phytotherapie. 15: 82-91
3. Bonati, A. 1991. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation ?. *J. of Ethnopharmacology*. 32: 195-197.
4. Brain, K.R., Turner, T.D. 1975. The Practical Evaluation of Phytopharmaceutical. Wright-Scientifica. Bristol.
5. Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie, Phytocheimie, Plantes Medicinales. Ed. 2. Tee-Doc Lavoisier, Paris.
6. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1996. Farmakope Indonesia. Ed. IV. Jakarta. Indonesia.
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. Materia Medika Indonesia. Ed. VI. Jakarta. Indonesia.
8. Eberwein, B., Helmstaedter, G., Reimann, J., Schoenenberger, H., Vogt, C. 1984. (Ed.) Pharmazeutische Qualitaet von Phytopharmaka. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
9. Hanke. G. 1984. (Ed.). Qualitaet Pflanzenlicher Arzneimittel. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
10. Harnischfeger, G. 1985. Qualitaetskontrolle von Phytopharmaka. George Thieme Verlag. Stuttgart.
11. Keller, K. 1991. Legal requirements for the use of phytopharmaceutical drugs in the Federal Republic of Germany. *J. of Ethnopharmacology*. 32: 225-229.
12. List, P.H., Schmidt, P.C. 1989. Phytopharmaceutical Technology. Boca Raton, Ann Arbor, Boston: CRC Press.

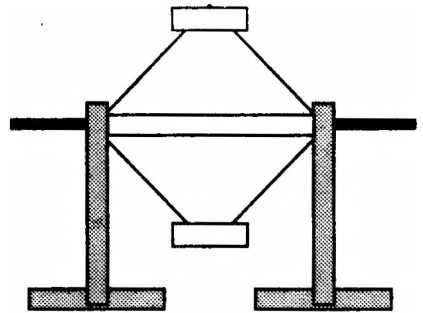
LAMPIRAN -1 : GAMBAR SKEMA ALAT-ALAT EKSTRAKSI

JENIS-JENIS MIXER UNTUK EKSTRAKSI MASERASI

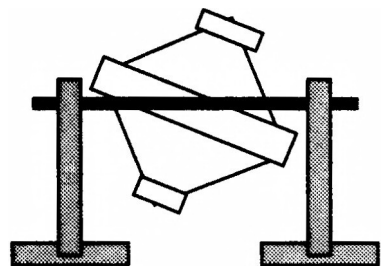
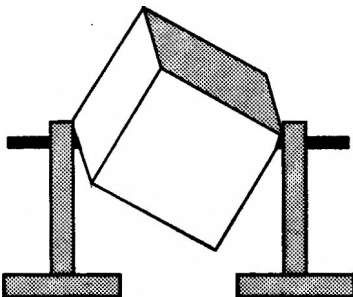
MIXING BARREL



TETRAHEDRAL MIXER



TWIN CONE MIXER

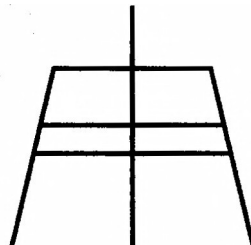
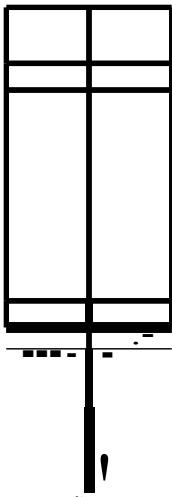
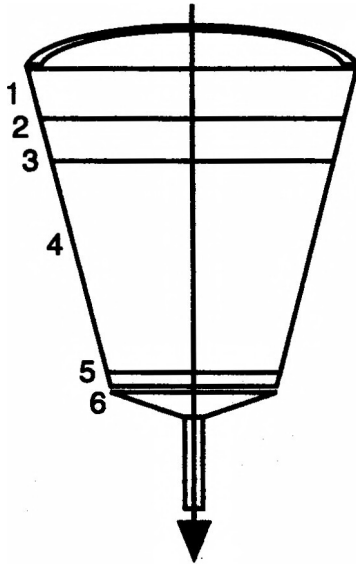


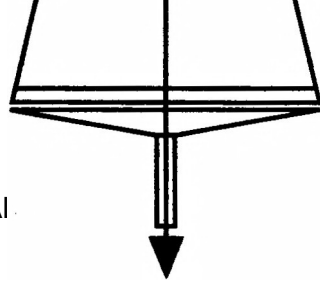
CUBIC MIXER

| INCLINED TWIN CONE MIXER |

LAMPIRAN-1: GAMBAR SKEMAALAT-ALAT EKSTRAKSI LANJUTAN

JENIS-JENIS PERKOLATOR UNTUK EKSTRAKSI

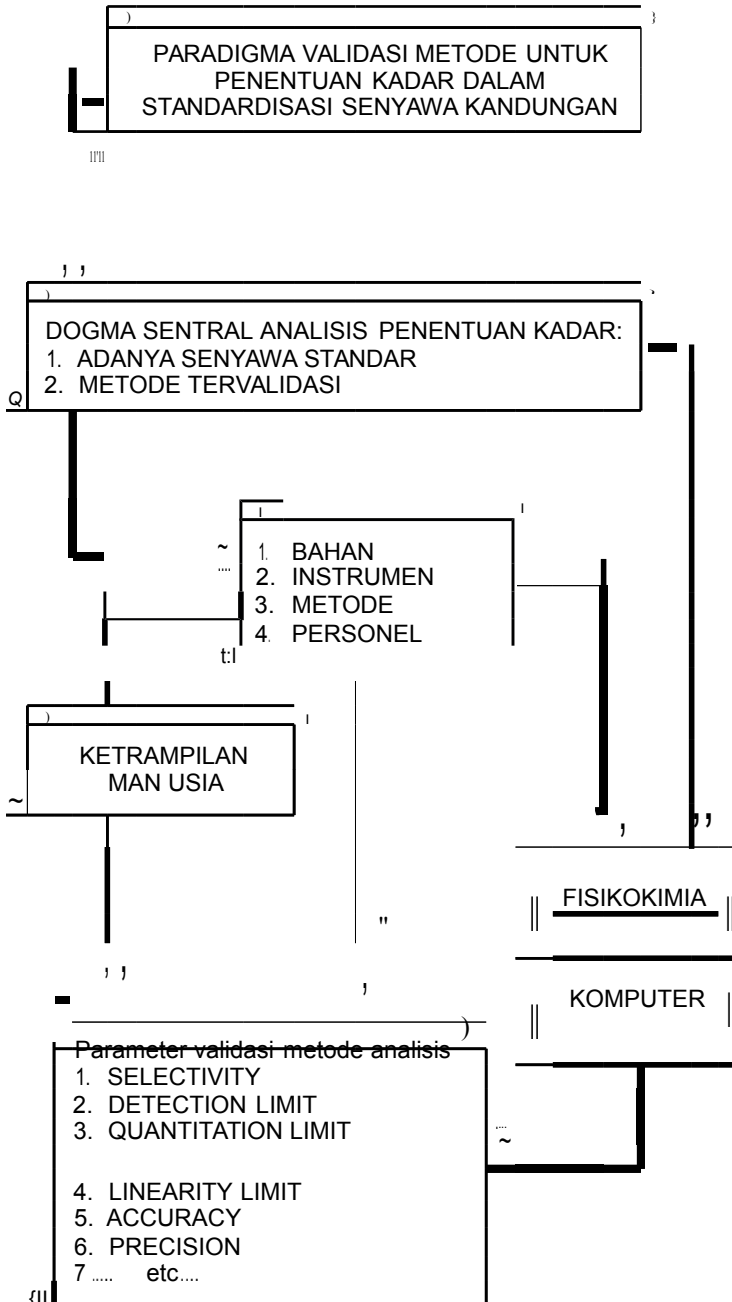




LAMPIRAN-2 INSTRUMEN ANALISA

NO	INSTRUMENT	DATA DAN PENGGUNAAN	
		IDENTIFIKASI	PENETAPAN KADAR
1.	Spektrofotometer UV-Vis (UV-Vis)	Pola spektra UV-Vis spesifik	Golongan senyawa kandungan
2.	Spektrofotometer fluoresensi (FL)	Pola spektra eksitasi-emisi spesifik	Golongan senyawa kandungan
3.	Spektrofotometer infra merah (IR)	Pola spektra IR spesifik	Jarang digunakan
4.	Spektrometer RMI (NMR)	Pola spektra IR spesifik	Tidak dapat
5.	Spektrometer masa (MS)	Spektra masa	Tidak dapat
6.	Densitometer (TLC-Scanner)	Pola dan spektra UV-Vis bercak	golongan senyawa dan komponennya
7.	Kromatograf Cair Kinerja Tinggi (HPLC)	Pola kromatogram	Komponen
8.	Kromatograf Gas (GC)	Pola kromatogram	Komponen
9.	Kombinasi instrumen : 1. HPLC-DAD 2. GC-MS 3. GC-FTIR 4. LC-MS 5. LC-NMR	Simultan : Pola kromatogram dan identifikasi struktur komponen yang terpisahkan berdasarkan spektra	

LAMPIRAN-3 VALIDASI METODE ANALISIS KADAR



LAMPIRAN-4

Metode 5-1

METODE ANALISIS :

MULTIRESIDU PESTISIDA ORGANOKLOR DAN ORGANOFOSFAT

(Diadopsi dari the AOAC Official Method 970.52)

5-1.1 Ruang Lingkup

Metode ini digunakan untuk penetapan residu pestisida organoklor dan organofosfat dalam ekstrak obat tradisional.

5-1.2 Prinsip

Cuplikan analitik yang telah dicampur dengan seksama diekstraksi dengan asetonitril (untuk ekstrak berkadar air tinggi), atau dengan campuran asetonitril dan air (untuk ekstrak berkadar air rendah atau kandungan gula tinggi). Lemak diekstraksi dari ekstrak berlemak, dan dipartisikan di antara petroleum eter dan asetonitril. Sejumlah tertentu fase asetonitril (dari cuplikan analitik tak berlemak) atau seluruh fase asetonitril (dari cuplikan analitik berlemak) diencerkan dengan air dan residu diekstraksi ke dalam petroleum eter. Residu dibersihkan secara kromatografi pada kolom kromatografi Florisil, dielusi dengan campuran petroleum eter dan etileter. Setelah dipekatkan, residu dalam eluat ditetapkan secara kromatografi gas dan identifikasi dilakukan dengan paduan antara Kromatografi Gas, Kromatografi Lapis Tipis atau Kromatografi Kertas. Sebelum melakukan analisis residu pestisida, perlu dilakukan validasi terhadap kinerja metode (Bab 2 pasal 2-2.1 dalam buku asli) dan pemantauan kualitas metode pengujian intra laboratorium (Bab 2 pasal 4-2.1). Nilai perolehan kembali senyawa baku pembanding yang ditambahkan harus lebih besar atau sama dengan 80%. Tidak adanya gangguan baik yang berasal dari laboratorium maupun karena kontaminasi pereaksi yang digunakan dalam seluruh tahapan analisis, harus dijamin dengan kinerja yang diperlihatkan oleh hasil analisis blanko pereaksi secara berkala. Perlu diperhatikan bahwa dalam setiap analisis selalu digunakan pelarut dalam jumlah yang besar, sehingga menimbulkan gangguan yang nyata. Meskipun pelarut dengan kemurnian yang memadai dapat diperoleh secara komersial, tetapi kemungkinan adanya gangguan yang berasal dari pelarut, harus selalu diuji untuk setiap kemasan pelarut yang akan digunakan. Disamping itu, pereaksi lain dan peralat yang digunakan terutama yang terbuat dari karet, plastik, wol kaca dan lain-lain juga merupakan sumber gangguan yang potensial. Informasi lanjut tentang gangguan ini dapat dilihat dalam berbagai kepustakaan.

5-1.3 Perekasi Umum

Pelarut atau pereaksi yang digunakan untuk analisis residu pestisida, dianjurkan kelas residu pestisida. Jika yang dipergunakan bukan kelas residu pestisida, pelarut atau pereaksi harus dimurnikan dengan cara disuling menggunakan penyuling yang seluruhnya terbuat dari gelas. Lakukan penyulingan dengan hati-hati.

Uji kemurnian pelarut

Kromatografi Gas yang dilengkapi dengan detektor penangkap elektron mengharuskan penggunaan pelarut tanpa bahan yang menyebabkan detektor memberikan respons seperti yang diindikasikan pada uji berikut: Masukkan 300 ml pelarut ke dalam pemekat Kuderma Danish yang dilengkapi dengan pendingin kolom Snyder 3 bola dan labu penampung berskala, uapkan hingga 5 ml. Suntikkan 5 μ l pekatan ke dalam Kromatografi Gas dengan kondisi seperti yang tercantum pada pasal 5-1.5.c. Pekatan tidak boleh menyebabkan penyimpangan lebih dari 1 mm dari garis dasar (base-line) selama 2-60 menit setelah penyuntikan.

- (1) Asetonitril (Lihat uji kemurnian pelarut). Pemurnian asetonitril kelas teknis sebagai berikut : 4 L asetonitril ditambah 1 ml asam fosfat, 30 g penta fosfit dan beberapa butir batu didih, suling dengan penyuling yang seluruhnya terbuat dari gelas pada suhu 81-82°C. Suhu tidak melebihi 82°C.
- (2) Asetonitril jenuh petroleum eter. Jenuhkan asetonitril dengan petroleum eter.
- (3) Etanol atau metanol
- (4) Larutan etanol alkalis 2%. Larutkan 2 g kalium hidroksida dalam etanol dan encerkan sampai 100 ml.
- (5) Eluen 6%. Campurandietil eter dan petroleumeter (6:94, v/v)
- (6) Eluen 15%. Campurandietil eter dan petroleumeter (15:85, v/v)
- (7) Eluen 50%. Campurandietil eter dan petroleum eter (50:50 v/v)
- (8) Dietil eter. Simpan di bawah gas nitrogen. Tambahkan 2% etanol. Harus bebas dari peroksida.
- (9) Florisil. Kelas PR, 60-100 mesh, yang telah diaktivasi pada suhu 675°C. Jika Florisil yang telah diaktivasi pada 675°C dalam jumlah besar, segera setelah dibuka dipindahkan dalam wadah gelas lebih kurang 500 ml, atau botol dengan tutup kaca atau tutup ulir yang diberi lapisan kertas aluminium, dan simpan ditempat gelap. Sebelum digunakan, panaskan pada suhu 130°C tidak kurang dari 5 jam. kemudian simpan pada suhu 130°C dalam botol bertutup kaca atau dalam desikator kedap udara pada suhu kamar dan apabila waktu penyimpanan lebih dari 2 hari, perlu dipanaskan kembali pada suhu 130°C. Buat larutan baku campuran pestisida dalam heksana yang terdiri dari ronnel, etion, heptaklorepoksida, paration, dieldrin, endrin dan malation, dengan kadar berturut-turut 1 ;4;1 ;2;1 ;2; 4 μ g/ml.

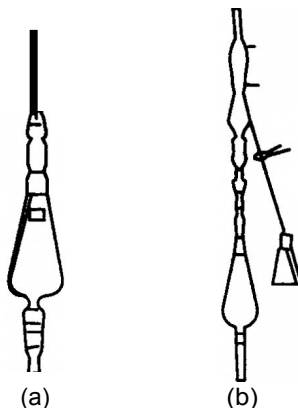
(10) Uji setiap batch Florisil yang telah diaktivasi dengan 1 ml larutan baku campuran pestisida pada kolom Florisil yang telah disiapkan dan

lakukan elusi seperti tertera dalam pasal 5-1.12. Eluat hasil elusi kolom Florisil dipekatkan sampai 10 ml. Suntikan sejumlah tertentu (lihat pasal 5-1.5) dari setiap eluat ke dalam Kromatografi Gas dan tetapkan hasil perolehan kembali setiap senyawa secara kuantitatif heptaklor epoksida, ronnel dan etion dengan eluen 6%; dieldrin, endrin dan paration dengan eluen 15%; serta malation dengan eluen 50%. Daya serap berbagai lot Florisil dapat diuji dengan asam laurat dan variasi dalam daya serap dapat dikompensasi dengan mengatur ukuran kolom. Sebelum digunakan, uji kolom yang telah disesuaikan tersebut dengan melakukan uji elusi seperti di atas.

- (11) Heksana
- (12) Magnesium oksida. Magnesia serap. Suspensikan lebih kurang 500 g magnesia dengan air, panaskan pada tangas air lebih kurang 30 menit, dan saring dengan pengurangan tekanan. Keringkan semalam pada suhu 105-130°C, dan gerus sampai menjadi serbuk yang dapat melalui ayakan No. 60. Simpan dalam wadah tertutup.
- (13) Campuran magnesia Celite. Campur magnesia oksida (k) dengan Ce1ite 546 (1: 1). Celite yang dapat digunakan adalah celite yang bila diekstraksi dengan petroleum eter hasil ekstraksinya bebas dari senyawa yang dapat memberi signal pada detektor penangkap elektron.
- (14) Petroleum eter
- (15) Natrium sulfat anhidrat granul

5-1.4 Peralatan Umum

- (1) Blender kecepatan tinggi;
- (2) Kolom kromatografi. 300 mm x 22 mm. dengan kran teflon dan cakram kaca masir atau wol kaca yang dimampatkan pada dasar kolom;
- (3) Kolom kromatografi, 400 mm x 22 mm. tanpa kran;
- (4) Tabung penyaring, dengan ukuran kurang lebih 200 mm x 22 mm dengan ujung tabung yang pendek dan cakram kaca masir kasar atau wol kaca yang dimampatkan pada dasar kolom;



- (5) (a). Pemekat Kuderma-Danis

(b). PemekatKuderma-DanisdhenganPenampungPelarut yangdiuapkan

- (6) Pemekat Kuderma-Danish 500 ml dan 1000 ml dengan kolom pendingin Snyder dan labu penampung berskala atas labu 5 ml atau 10ml.
- (7) Corong pisah 1000 ml dan 125 ml dengan tutup teflon.
- (8) Kolom pendingin Snyder.
- (9) Kolom pendingin mikro.

5-1.5

Peralatan untuk Kromatografi Gas (KG)

Sistem Kromatografi Gas bila dioperasikan dengan kolom dan kondisi seperti tercantum dalam pasal 5-1.15, apabila dilengkapi dengan detektor penangkap elektron harus dapat menunjukkan penyimpangan 1/2 skala penuh terhadap 1 ng heptaklorepsid, sedangkan bila dilengkapi dengan detektor termionik KCI harus dapat menunjukkan penyimpangan 1/2 skala penuh terhadap 2 ng paration, dan harus dapat memisahkan campuran heptaklor, aldrin, heptaklor epoksid, etion dan karbofenotion. membentuk puncak-puncak yang terpisah pada garis dasar. Waktu tambat untuk aldrin harus lebih kurang 45 menit. Residu pestisida yang dianalisis tidak boleh mengalami degradasi pada setiap bagian sistem Kromatografi Gas tersebut.

- (a) Kromatograf Gas (KG). Instrumen terdiri dari sistem penyuntik on column, kolom gelas dalam oven pemanas yang terkontrol dengan ketelitian lebih kurang 0,1°C, detektor penangkap elektron dan detektor termionik, masing-masing dengan sumber energi yang berbeda, elektrometer dan pencatat mV yang sesuai.
- (b) Kolom KG. Kolom gelas ukuran 1,85 m x 4 mm. diisi dengan 10% (bib) Dow Corning, DC-200 (dapat diganti dengan OV-101) pada padatan penyangga:
 - (1) Chromosorb W HP 80-100 mesh
 - (2) Gas Chrom Q 80-100 mesh
 - (3) Anakrom ABS 80-90 Mesh

Timbang 2 g silikon cair Dow Corning 200 (12500 sentistokes) atau OV-101 di dalam gelas piala. Larutkan dalam kloroform dan pindahkan ke dalam labu Morton 300 ml menggunakan kloroform lebih kurang 100 ml. Tambahkan 18 g penyangga (1), (2) atau (3) ke dalam labu tersebut. Goyangkan labu dengan gerakan memutar dan diamkan selama lebih kurang 10 menit. Pasang labu pada rotary evaporator dan uapkan kloroform dengan pemutaran labu secara perlahan dalam tangas air pada suhu 50°C dan sedikit pengurangan tekanan (kemungkinan terjadi busa pada permulaan penguapan). Bila padatan terlihat basah, pengurangan tekanan perlu diperbesar. Uapkan sisa kloroform tanpa pemutaran atau dengan aliran udara.

Bahan yang digunakan untuk mengisi kolom hanya yang berbentuk serbuk kering. Pada waktu pengisian kolom, pada setiap tahap harus dijaga supaya penyangga tidak retak/pecah. Kolom yang sudah jadi: kemudian dikondisikan dengan pemanasan pada suhu 250-260°C dengan aliran gas nitrogen dengan laju aliran kurang 100 ml/menit selama 48 jam atau sampai endrin yang disuntikkan memperlihatkan puncaktunggal.

- (c) Detektor penangkap elektron (ECD) ^{63}Ni . Detektor penangkap elektron yang lain yang dapat digunakan adalah detektor ^3H dengan desain konsentris dan tegangan arus searah yang tidak dipasarkan lagi. Detektor penangkap elektron ^{63}Ni dengan arus konstan dan frekuensi yang bervariasi, dioperasikan pada kondisi tertentu yang memberikan respons linear yang stabil dengan ulangan yang baik dan stabil. Pada kondisi optimum, detektor ^{63}Ni dapat menghasilkan respon yang lebih peka dibanding detektor ^3H . Untuk menjaga agar batas penetapan sama dengan detektor ^3H , berat ekuivalen contoh yang disuntikkan ke dalam sistem detektor ^{63}Ni secara proporsional lebih rendah. Respons relatif terhadap pestisida yang diperoleh dengan detektor penangkap elektron ^{63}Ni dapat berbeda dari pada yang diperoleh dengan detektor penangkap elektron ^3H . Gas pembawa yang direkomendasikan untuk digunakan dengan detektor ^{63}Ni adalah campuran gas Argon-metana, tetapi penggunaan gas Argon-metana ini tidak direkomendasikan apabila digunakan sistem penetapan ganda dengan detektor termionik KCl (KCITD).
- (d) Detektor termionik KCl (KCITD).
- (e) Gas hidrogen. Dari generator atau silinder yang berisi gas hidrogen dengan tekanan tinggi. Lengkapi silinder dengan pengatur tekanan berupa tabung kapiler dari baja nir karat, untuk menurunkan tekanan pada keluaran laju aliran lebih kurang 30 ml/min pada tekanan 20 lb. Tempatkan sumber gas hidrogen dekat detektor.
- (f) Laju alir. Laju aliran minimum yang diperlukan untuk detektor termionik adalah 300 ml/min. Untuk ini direkomendasikan penggunaan silinder dengan udara bertekanan tinggi atau pompa udara akuarium.
- (g) Pipa kapiler T
- (h) Perkaitan sistem detektor ganda dengan susunan seri. Hubungkan keluaran u1ung ECD langsung dengan KCITD.
- (i) Perkaitan sistem detektor ganda dengan susunan seri. Atur hubungan keluaran dari ECD yang mempunyai laju aliran 120 ml/menit sedemikian rupa, sehingga yang masuk ke KCITD mempunyai laju aliran 60 ml/menit.
- (j) Perkaitan sistem detektor ganda dengan susunan paralel. Aturlah sedemikian rupa, sehingga efluen yang masuk ke dalam kolom dengan laju aliran 120 ml/ min dibagi melalui pembagi aliran 1: 1.

hingga setiap detektor menerima efluen dengan laju aliran 60 ml/min. Aliran ke ECD ditingkatkan dengan memasukkan gas Nitrogen dari

sumber gas Nitrogen ke 2 (c) melalui pipa kapiler T.

- (k) Pengoperasian detektor termionik kalium klorida (lihat manual instrumen yang digunakan)

5-1.6 Pemekatan Ekstrak yang telah dibersihkan

Perhatian: Penguapan ekstrak yang telah dibersihkan tidak boleh sampai kering, karena dapat menimbulkan masalah kehilangan pestisida.

- (a) Pemekatan sampai lebih kurang 5 ml atau lebih. Uapkan pada tangas

uap dalam pemekat Kuderna-Danish yang dilengkapi dengan kolom pendingin Snyder dengan 3 bola dan labu penampung berskala, juga diperlukan batu didih 20 mesh.

- (b) Pemekatan sampai kurang dari 5 ml. Uapkan sampai lebih kurang 5 ml seperti pada a. Lepaskan labu penampung dan pasang di atas kolom pendingin Snyder mikro 2 bola atau kolom pendingin Vigreux mikro. Uapkan sampai sedikit di bawah volume yang dikehendaki. Biarkan kondensat turun kedalam labu penampung, kemudian lepaskan kolom pendingin. Volume minimum yang diperbolehkan harus diantara 0,2 - 0,4 ml.

5-1.7 Pemekatan Ekstrak yang mengandung Lemak Hewan, Minyak Nabati atau Bagian Tanaman yang terekstraksi

- (a) Pemekatan dengan pemekat Kuderna-Danish. Dilengkapi dengan kolom berskala, pendingin Snyder 3 bola dan labu penampung. Gunakan pada tangas uap air.
- (b) Pemekatan dengan flash evaporator. Tempatkan labu dalam tangas pemanas air pada suhu kamar.
- (c) Pemekatan dalam gelas piala. Uapkan dalam gelas piala dalam tangas air pada suhu 35-40°C di bawah aliran udara kering dan bersih. Keluarkan gelas piala dari tangas air dan alirkan udara segera setelah pelarut menguap semua. Biarkan sisa air menguap dengan sendirinya. Sisa pelarut dapat diuapkan dari lemak pada tangas uap air untuk jangka waktu yang pendek.

5-1.8 Penyiapan Cuplikan Analitik dan Ekstraksi Bahan Ekstrak Tak Berlemak

Campur dengan seksama untuk mendapatkan cuplikan analitik yang homogen sebelum diambil sebagian untuk dianalisis. Giling bahan kering atau berkadar air rendah hingga melewati ayakan No. 20 dan campur dengan seksama. Lanjutkan dengan prosedur a atau b.

- (a) Bahan berkadar air tinggi (kadar air lebih tinggi dari 75%)
 Tambahkan 200 ml asetonitril dan 50 ml air pada 100 g cuplikan analitik dalam blender, dan lanjutkan seperti pada 10.1. Pindahkan lebih kurang 250 ml ekstrak yang sudah disaring (catat volume sebagai F) ke dalam corong pisah 1 L dan lanjutkan seperti 5-1.8.C.
- (b) Bahan kering atau berkadar air rendah
 Tambahkan 350 ml campuran 35% air dengan asetonitril (350 ml air diencerkan dengan asetonitril sampai 1 L) pada 20-50 g cuplikan analitik yang sudah digiling dalam blender (apabila diperlukan

cuplikan analitik yang lebih besar, tambahkan campuran pelarut untuk

ekstraksi hingga dapat membasahi seluruh cuplikan analitik dan memungkinkan pencampuran dengan seksama). Lumatkan selama 5 menit pada kecepatan tinggi, dan lanjutkan seperti pada langkah (5-1.8.1), mulai dari "Saring dengan pengurangan tekanan". Pindahkan 250 ml ekstrak yang sudah disaring (catat volume sebagai F) ke dalam corong pisah 1 L, dan lanjutkan seperti pada (5-1.8.C).

- (c) Pemindahan residu ke dalam petroleum eter

Ukur dengan tepat 100 ml petroleum eter dan masukkan ke dalam corong pisah yang telah berisi saringan. Kocok kuat-kuat selama 1-2 menit dan tambahkan 10 ml larutan natrium klorida jenuh dan 600 ml air. Kocok kuat-kuat dengan posisi corong pisah horizontal selama 30-45 detik. Biarkan lapisan memisah, buang lapisan air dan lapisan petroleum eter dicuci perlahan-lahan dengan 2 x 100 ml air. Buang air cucian, pindahkan lapisan petroleum eter ke dalam gelas ukur 100 ml bertutup kaca dan catat volume ekstrak yang didapat (sebagai P). Tambahkan lebih kurang 15 g natrium sulfat anhidrat dan kocok kuat-kuat. Supaya tidak terjadi adsorpsi residu pada natrium sulfat, ekstrak petroleum eter harus segera dipisahkan dari natrium sulfat, jangan biarkan ekstrak bercampur dengan natrium sulfat selama lebih dari 1 jam, dan pekatkan dalam pemekat Kuderna-Danish sampai 5-10 mL kemudian pindahkan larutan pekat tersebut langsung ke dalam kolom Florisil. Pasal 5-1.12.

- (d) Perhitungan berat cuplikan analitik untuk ekstrak berkadar air tinggi yang ekuivalen dengan volume ekstrak petroleum eter yang diperoleh.

Hitung berat cuplikan analitik dengan rumus berikut:

$$S \times (FIT) \times (P/100) \text{ g}$$

dengan S : berat (dalam gram) cuplikan analitik yang ditimbang; F: volume saringan dalam ml; T; volume total jumlah volume (dalam ml) air dalam cuplikan analitik dan asetoneitril yang ditambahkan dikurangi dengan koreksi kontraksi volume; P: volume ekstrak petroleum eter (dalam ml) yang digunakan dalam partisi residu.

Apabila 50 ml air ditambahkan pada asetoneitril untuk ekstraksi suatu bahan dengan kadar gula tinggi, volume total (T) dinaikkan dengan 45; misalnya cuplikan analitik dengan kadar air 85%, $T = 325$ bukan 280. Conteh : 100 g cuplikan analitik mengandung 85 g air; ditambah 200 ml asetoneitril; kontraksi volume 5 ml, maka volume total (T) adalah 280 ml. Bila volume saringan (F) 235 ml, kemudian dipartisikan dengan 100 ml petroleum eter, volume ekstrak petroleum eter yang diperoleh (P) 85 ml, maka residu yang terdapat dalam ekstrak petroleum eter seberat $100 \text{ g} \times (235/280) \times (85/100) = 71 \text{ g}$.

Kecuali untuk volume total (T) = (ml air dalam cuplikan analitik dijumlahkan dengan ml 35% air dalam asetoneitril yang ditambahkan koreksi terhadap kontraksi volume dalam ml). Apabila kandungan air cuplikan analitik kurang atau sama dengan 10%, dapat diabaikan dan gunakan volume campuran ekstrak sebagai (T).

- (e) Perhitungan berat cuplikan analitik untuk bahan kering atau berkadar

air rendah yang ekuivalen dengan volume ekstrak petroleum eter yang diperoleh.

Hitung berat cuplikan analitik seperti pada pasal 5-1.8.

5-1.12 Pembersihan dengan Kolom Florisil

Siapkan kolom Florisil dengan diameter dalam 22 mm (butir 5-1.4.b), berisi

10 cm Florisil yang telah diaktivasi atau sejumlah yang telah ditetapkan dengan uji asam laurat (butir 5-1.3.i), dan tutuplah bagian atas Florisil dengan lapisan natrium sulfat anhidrat lebih kurang 1 cm. Basahi kolom dengan 40-50 ml petroleum eter. Sebagai penampung eluat, gunakan pemekat Kuderna-Danish dengan labu penampung berskala. Alirkan ekstrak pekat petroleum eter ke dalam kolom, atur tutup keran teflon hingga diperoleh kecepatan alir 5 ml/menit. Silas wadah ekstrak pekat petroleum eter dan natrium sulfat dengan 2 x 5 ml petroleum eter, tuangkan bilasan ke dalam kolom, bilas dinding kolom dengan sedikit petroleum eter dan elusi dengan 200 ml eluen 6% (butir 5-1.3.e) pada laju aliran 5 ml/menit. Ganti labu penampung dan elusi dengan 200 ml eluen 15% (butir 5-1.3.f), pada laju aliran 5 ml/menit. Ganti labu penerima dan elusi dengan 200 ml eluen 50% (butir 5-1.3.g), pada laju aliran 5 ml/menit.

Pekatkan masing-masing eluat dengan pemekat Kuderna-Danish sampai volume yang sesuai untuk prosedur penetapan berikutnya. Bila diperlukan volume lebih kecil dari pada 5 ml, gunakan kolom pendingin Snyder 2 bola atau kolom pendingin Vigreux mikro.

Eluat pertama (6%) mengandung residu pestisida organoklor (aldrin, BHC, ODE, DOD (TOE), o,p'-dan p,p'-DDT, heptaklor, heptaklorepoksida, lindan, metoksiklor, mirex dan etilen), bahan kimia industri [poliklorobifenil (FCB) dan residu pestisida organofosfat (etion dan ronnel) dan pada umumnya telah dapat disuntikkan langsung ke dalam kromatograf gas. Apabila ternyata masih diperlukan pembersihan lebih lanjut, ulangi prosedur pembersihan dengan kolom Florisil menggunakan kolom Florisil baru. Eluat kedua (dari eluen 15%) mengandung residu pestisida organoklor (dieldrin dan endrin) dan residu pestisida organofosfat (diazinon, metilparation, dan paration). Eluat ketiga (dari eluen 50%) mengandung residu organofosfat (malation).

5-1.15 Metode Penetapan dengan Kromatograf Gas, Identifikasi Tentatif dan Pengukuran Kuantitatif

Dapat diterapkan terhadap pestisida organoklor, pestisida organofosfat, dan poliklorobifenil (PCB). Metode ini dapat diterapkan terhadap residu PCB bila terdapat sebagai kontaminan tunggal dalam contoh. Tetapi apabila senyawa pestisida atau senyawa lain juga terdeteksi dalam kromatogram residu PCB, perlu dilakukan perlakuan kimiawi atau fisika lain untuk menghilangkan atau mengurangi interferensi senyawa-senyawa tersebut sebelum dilakukan kuantitasi PCB.

Suntikkan ke dalam Kromatograf Gas (butir 5-15.1), sejumlah tertentu hasil pemekatan eluat dari kolom eluat dari kolom Florisil atau kolom Magnesium Oksalat, yang sesuai (3-8 μ l) menggunakan jarum suntikan

10 μ l, yang mengandung senyawa dalam jumlah yang termasuk dalam rentang linearitas. Tentukan identitas puncak residu secara tentatif dengan dasar waktu tambat. Ukur luas atau tinggi puncak-puncak residu dan tetapkan jumlah residu dengan membandingkan terhadap luas atau tinggi puncak dari baku pembanding yang sesuai, yang telah diketahui jumlahnya. Untuk mendapatkan data pengukuran jumlah residu yang valid, perbedaan ukuran puncak residu dan puncak baku pembanding harus di bawah 25%. Suntikkan baku pembanding ke dalam kromatograf gas segera setelah proses kromatografi cuplikan analitik selesai.

Tetapkan residu PCB dengan membandingkan tinggi atau luas total puncak-puncak residu terhadap tinggi atau luas total puncak-puncak baku pembanding berbagai Aroclor yang sesuai. Ukur tinggi atau luas total respon dari garis dasar yang merupakan garis dasar bersama di bawah seluruh puncak yang diukur. Dari kromatogram cuplikan analitik, gunakan hanya puncak yang telah diketahui dengan jelas merupakan puncak dari klorobifenil. Puncak-puncak ini juga harus terdapat dalam kromatogram baku pembanding PCB. Campuran berbagai Aroclor mungkin diperlukan untuk memperoleh pola Kromatografi Gas yang sesuai dengan cuplikan analitik dan baku pembanding.

(a) Kondisi pengoperasian Kromatografi Gas yang dianjurkan untuk kolom DC-20010% atau OV-101. Kolom gelas ukuran 1,8 m x 4 mm, suhu injektor 225°C, kolom 200°C, detektor penangkap elektron 3H maksimum 210°C, lajur aliran gas pembawa (nitrogen) minimum 120 ml/me nit.

(b) Detektor penangkap elektron (ECO)

Gunakan untuk penetapan residu pestisida organoklor dalam ekstrak yang mengandung lemak.

Atur tegangan untuk pengoperasian detektor penangkap elektron ^3H (lebih kurang 50 V arus searah) yang dapat memberikan penyimpangan lebih kurang 40-50% skala penuh pencatat terhadap 1 ng heptaklor epoksida, pada sensitivitas skala penuh 1 atau 3 x 10⁹ amper.

Operasikan detektor penangkap elektron ^{63}Ni sedemikian hingga diperoleh respons yang stabil, terdapat keberulangan yang baik dan linear. Atur jumlah cuplikan analitik yang disuntikkan untuk mengatasi perbedaan sensitivitas instrumen.

(c) Deteksi ganda termionik kalium klorida dan penangkap elektron.

Gunakan salah satu dari 3 sistem deteksi ganda yang tercantum dalam pasal 5-1.7 bagian h, l, atau untuk penetapan pestisida organofosfat, organoklor dan PCB. Sistem yang diuraikan pada pasal

5-1.7.h lebih disukai karena kesederhanaan dan kemudahan dalam pengoperasiannya.

(1) Sistem detektor ganda seri

Operasikan ECO seperti pada 5-1.15.b. Untuk KCITD. atur laju alir gas hidrogen hingga diperoleh kuat arus garis dasar kira-kira $0,2 - 0,8 \times 10^{-8}$ ampere dan pilih kedudukan elektrometer yang dapat memberikan penyimpangan lebih kurang 40-50% dari skala penuh

- pada rekorder terhadap 2 ng paration.
- (2) Sistem detektor ganda seri terpisah
Sama seperti pada (3), paralel, kecuali ECO menerima seluruh eluen yang disuntikkan ke dalam kolom, sedangkan KCITD menerima 1/2 eluen dari yang disuntikkan.
- (3) Sistem detektor ganda paralel
Sama seperti pada sistem detektor ganda seri (1), kecuali eluen kolom dibagi dua, oleh karena itu suntikkan 2 kali lebih banyak cuplikan analitik untuk mendapatkan batas penetapan yang diinginkan.

Metode 14-1

METODE ANALISIS MULTIRESIDU PESTISIDA ORGANOKLOR DAN ORGANOFOSFAT

Kromatografi Lapis Tipis pada Fase Diam Alumina dengan Deteksi Fotokimiawi

(Diadopsi dari the AOAC Official Method 970.52, Method I)

14-1.1 Ruang Lingkup

Metode ini digunakan untuk penetapan residu pestisida organoklor dan organofosfat setelah melalui tahapan-tahapan analisis sesuai dengan tercantum dalam Bab 5 metode 5-1, sampai dengan elusi fraksinasi pada kolom Florisil, yaitu eluat Florisil 6% yang mengandung residu pestisida organoklor (aldrin, BHC, ODE, o,p'-dan DDT, heptaklor, heptaklor epoksida, lindan, metoksiklor, mireks dan etilin), senyawa poliklorobifenil dan residu organofosfat (etion dan ronnel); eluat Florisil

15% yang mengandung residu pestisida orgnoklor (dieldrin dan endrin)

dan residu pestisida organofosfat (diazinon, metilparation, dan paration);

eluat Ftorisil 50% mengandung residu pestisida organofosfat malation.

14-1.2 Prinsip

Fraksi eluat Florisil 6% dipisahkan pada sistem KLT dengan fase diam alumina dan fase gerak n-heptana, sedangkan pemisahan fraksi eluat Florisil 15% dilakukan pada sistem KLT dengan fase diam alumina dan fase gerak aseton-n-heptana (2:98, v/v). Pengembangan kedua sistem KLT dilakukan sekaligus dalam satu bejana pengembang yang telah dijenuhi dengan aseton-n-heptana (2:98, v/v).

F raksi eluat Florisil 50% dipisahkan pada KLT dengan fase diam 15 atau

20% N,N-dimetilformamida dalam dietil eter (yang dilapiskan pada pendukung alumina) dan fase gerak metilsikloheksana. Pengembangan dilakukan dalam bejana yang telah dijenuhi dengan metilsikloheksana. Visualisasi dilakukan dengan pemaparan KLT yang telah disemprot dengan pereaksi kromogenik yang spesifik untuk masing-masing golongan residu pestisida, pada sinar Ultra Violet.

14-1.3 Pereaksi

- (a) Aluminium oksida, $Al_2O_3 \cdot G$ netral atau yang setara untuk Kromatografi Lapis Tipis, atau lempeng KLT alumina dengan ketebalan 0,25 mm.
- (b) Pelarut pengembang untuk pestisida organoklor
 - (1) n-heptana,
 - (2) n-heptana mengandung 2% aseton
- (c) Pereaksi kromogenik untuk pestisida organoklor
Larutkan 0,100 g perak nitrat ($AgNO_3$) dalam 1 ml air, tambahkan 20 ml 2-fenoksietanol, encerkan dengan aseton sampai volume 200 ml, campur dan tambahkan satu tetes (kecil) hidrogen peroksida (H_2O_2) 30%. Simpan dalam tempat gelap semalam, kemudian enap tuangkan ke dalam botol penyemprot. Larutan ini tahan selama 4 hari.
- (d) Pelarut pengembang untuk pestisida organofosfat
 - (1) Imobil. Larutan 15 atau 20% N, N-dimetilformamida (DMF) dalam eter. Encerkan 75 atau 100 ml DMF dengan eter sampai 500 ml dan campur.
 - (2) Mobil.-Metilsikloheksana.
- (e) Pereaksi kromogenik untuk pestisida organofosfat
 - (1) Larutan induk pewarna. Larutkan 1 g tetrabromo-fenolftalein etil ester dalam 100 ml aseton
 - (2) Larutan pewarna. Encerkan 10 ml larutan induk pewarna (1) dengan aseton sampai 50 ml.
 - (3) Larutan peraknitrat. Larutkan 0,5 g perak nitrat ($AgNO_3$) dalam 25 ml air dan encerkan dengan aseton sampai 100 ml.
 - (4) Larutan asam sitrat. Larutkan 5 g sitrat granul dalam 50 ml air dan encerkan aseton sampai 100 ml.

14-1.4 Peralatan

- (a) Aplikator
- (b) Tempat penata lapis tipis
- (c) Rak pengering yang dapat memuat 10 lempeng kaca dengan ukuran 20 x 20 cm.
- (d) Desikator
- (e) Lempeng kaca, 20 x 20 cm
- (f) Bejana pengembang dan kelengkapannya dengan palung dari logam.
- (g) Bejana pencelup dan kelengkapannya, 22 x 22 cm dengan lebar bagian dalam 1/4- 3/16 dan penyangga serta penutup berbentuk U, kapasitas ± 300 ml
- (h) Pipet mikro untuk membuat spot
- (i) Botol penyemprot kromatografi
- (j) Pelapis bejana. Dua lembar kertas saring lembaran $12^{1/4} \times 8^{3/4}$ dan tekuk dan sesuaikan dengan bejana.
- (k) Lampu ultra violet dengan intensitas radiasi tinggi, beri tutup agar sinar lampu tidak mengenai mata dan kulit.

14-1.5 Prosedur

- (a) **Penyiapan Lapisan Penyerap**
 Cucilah lempeng kaca dalam air sabun panas, kemudian lanjutkan beberapakali dengan air yang telah didestilasi. Letakkan lempeng kaca tersebut pada tempat penatalapistipis dan tekan pada tempat yang telah tersedia. Sebelum diberi lapisan, bersihkan lempeng dengan sedikit alkohol. Tempatkan aplikator pada posisi 6 mm dari ujung kiri lempeng pertama yang akan dilapisi. Untuk melapisi 5 lempeng kaca, timbang 30 g Alumina G campurkan dengan 50 ml air, tutup, kocok selama 45 menit. Pengocokan yang terlalu kuat akan menimbulkan gelembung udara, mengakibatkan lapisan tidak rata. Suspensi penyerap dengan pengikatan memadat dengan cepat, oleh karena itu seluruh tahapan pembuatan lapistipis, mulai dari penyiapan suspensi sampai pelapisan final harus selesai dalam 2 menit. Setelah pengocokan, suspensi segera dituang ke dalam rongga pada aplikator. Atur posisi aplikator hingga suspensi mulai mengalir keluar melalui celah yang dikehendaki untuk menghasilkan ketebalan lapisan tertentu. Segera geser aplikator secara manual dengan gerakan yang tetap dan cepat. Untuk melapisi ke 5 lempeng kaca tersebut diperlukan waktu ± 5 detik. Segera setelah aplikasi, goyangkan perlahan-lahan atau ketuk-ketuk tempat penata lapis tipis untuk meratakan lapisan. Biarkan lapisan mengering pada tempat penata lapis tipis selama 15 menit kemudian keringkan di dalam oven dengan hembusan udara pada 80°C selama 30 menit. Ambil lempeng dan dinginkan. Periksa lapisan dengan cermat untuk mengetahui adanya lapisan yang tidak sempurna atau tidak rata dengan melihat sinar yang ditransmisikan dan direfleksikan oleh lapis tipis tersebut. Buang lempeng lapis tipis yang tidak sempurna. Buat 10 lempeng lapis tipis yang sempurna. Bersihkan aplikator dengan seksama dan keringkan sebelum dipakai lagi. Ke 10 lempeng lapis tipis tersebut dapat segera dicuci awal.
- (b) **Pencucian Awal Lapisan Adsorben**
 Dengan menggunakan silet, kerok lapisan penyerap selebar 1 cm dari salah satu sisi tepi lempeng KLT. Tuangkan 15 ml larutan 50% (v/v) aseton, dan letakkan potongan kertas saring tersebut pada sisi lempeng KLT yang dikerok, sedemikian hingga menutupi lapisan penyerap 6 mm. Letakkan lempeng KLT dalam bejana pengembang KLT dengan bagian yang dilekati dengan potongan kertas saring tercelup

dalam pelarut pengembang larutan 50% (v/v) aseton. Tutup rapat bejana pengembang dengan pita penutup, dan kembangkan lempeng KLT dengan pelarut pengembang larutan 50% (v/v) aseton hingga pelarut pengembang mencapai ketinggian 4 cm dari tepi atas lempeng (75-90 menit).

Keluarkan lempeng KLT dari dalam bejana pengembang, lepaskan potongan kertas saring yang tertempel pada lempeng, putar posisi lempeng dan keringkan dalam lemari asam biarkan selama lebih kurang 5 menit. Kemudian, pengeringan dilanjutkan dalam oven pada 80°C selama lebih kurang 45 menit. Ambil lempeng KLT dari oven, dinginkan dan simpan dalam desikator. Lempeng KLT ini dapat digunakan dalam jangka waktu kurang 1 (satu) minggu setelah penyimpanan.

(c) Penetapan

Sebelum penotolan cuplikan, persiapkan lempeng KLT sebagai berikut:

Beri tanda dengan pensil di kedua sisi pada jarak 4 cm dari tepi bawah lempeng KLT. Garis imajiner yang menghubungkan kedua tanda tersebut menunjukkan posisi penotolan cuplikan atau garis asal pengembangan KLT.

Dengan benda runcing, buatlah garis dari sisi kiri sampai dengan sisi kanan lempeng KLT (hingga menimbulkan goresan lenyap lapisan penyerap berbentuk kanal) pada jarak 14 cm dari sisi bawah lempeng KLT; garis ini mewakili garis depan pelarut pengembangan yang merupakan garis akhir pengembangan KLT.

Pada sisi bawah lempeng KLT, mulai jarak 2 cm dari sisi kiri buatlah

18 tanda berturut-turut dengan pensil, masing-masing dengan interval 1 cm (Jika diinginkan dapat dibuat lebih sedikit tanda dengan interval lebih lebar. Tanda-tanda ini digunakan sebagai penunjuk horisontal pada penotolan cuplikan. Identitas cuplikan dan baku pembanding dapat digoreskan langsung pada lapisan adsorbendi atas tanda-tanda, diatas garis akhir pengembangan KLT).

Garis penotolan imajiner pada dasarnya adalah garis bayangan penggariskayu yang disangga 2 cm di atas lempeng KLT, yang disinari dengan sumber sinar yang kuat. Atur garis bayangan tadi hingga menghubungkan 2 tanda pada sisi kiri dan kanan lempeng, 4 cm dari

sisi bawah. Gunakan garis bayangan dan 18 tanda di atas sebagai penunjuk vertikal dan horisontal pada waktu penotolan cuplikan. Untuk penetapan semi-kuantitatif yang optimum, totolkan sejumlah tertentu cuplikan sebagai berikut:

14-1.6 Pestisida Organoklor

(a) Penotolan

Perhitungkan sejumlah tertentu cuplikan yang ditotolkan agar menghasilkan bercak residu dalam rentang 0,005-0,1 μg . Totolkan baku pembanding dan campuran baku pembanding yang menghasilkan bercak 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; dan > 0,2 μg . Bercak cuplikan > 0,2 μg sukar untuk ditetapkan secara kuantitatif, sedangkan bercak cuplikan < 0,005 μg mungkin sukar untuk dibedakan. Totolkan semua eluat Florisil 6% pada

satu lempeng KLT, dan semua eluat Florisil 15% pada lempeng KLT yang lain.

(b) Pengembangan

Tempatkan pelapis bejana dan palung metal dalam bejana pengembang KLT (14-1.4.f).Jenuhkan pelapis dengan menuangkan

75 ml pelarut pengembang campuran aseton-n-heptana (2:98, v/v), (14-1.3.b.(2)), ke dalam dasar bejana 30 menit sebelum proses pengembangan lempeng KLT. Penjenuhan dimaksudkan untuk memperpendek waktu pengembangan dan memperbaiki keseragaman nilai Rf.

Untuk lempeng KLT yang ditotol dengan eluat Florisil 6%, tuangkan

50 ml n-heptana (14-1.3.b.(1)) ke dalam palung metal. Tempatkan sisi bawah lempeng KLT dalam palung metal dengan sisi atas lempeng tersandar pada dinding bejana pengembang KLT.

Untuk lempeng KLT yang ditotol dengan eluat Florisil 15%, gunakan campuran aseton-n-heptana (2:98, v/v) sebagai pelarut pengembang. Tempatkan sisi bawah lempeng KLT pada dasar bejana, dan sisi atas lempeng tersandar pada dinding bejana pengembang KLT.

Tempatkan penutup kaca pada bejana pengembang KLT dan tutup rapat dengan pita penutup. Apabila pelarut pengembang mencapai garis 10 cm di atas garis penotolan imajiner, keluarkan lempeng KLT dan keringkan di lemari asam selama 5 menit.

(c) Penyemprotan

Sandarkan salah satu sisi lempeng KLT pada suatu penyangga dan semprotkan pereaksi kromogemik, 14-f.3.c. cukup banyak pada lempeng KLT dengan gerakan lateral dan posisi botol penyemprot tegak lurus terhadap arah aliran pereaksi. Penyemprotan ini dilakukan hingga seluruh permukaan lapisan penyerap pada lempeng KLT menjadi basah dengan pereaksi kromogenik dan terlihat transluscent. Penyemprotan yang terlalu sedikit akan menyebabkan sensitivitas yang rendah. Setelah penyemprotan selesai, tiriskan lempeng KLT dalam lemari asam hingga kering selama 15 menit; kemudian segera tempatkan lempeng KLT di bawah sumber sinar UV, kemudian segera tempatkan lempeng KLT di bawah lampu UV intensitas tinggi.

(d) Pemaparan

Paparkan lempeng KLT pada sinar UV hingga bercak baku pembanding dengan konsentrasi terendah tampak jelas: 5 ng untuk sebagian besar pestisida organoklor akan tampak setelah 15-20 menit pemaparan dengan menggunakan peralatan seperti diuraikan dalam 14-1.4.k. Waktu pemaparan lebih dari atau sama dengan 30 menit tidak akan mempengaruhi lempeng KLT. Hasil terbaik akan didapat bila lempeng KLT ditempatkan pada posisi 8 cm dari permukaan bawah lampu UV.

16-1.7 Pestisida Organofosfat

(a) Penotolan

Perhitungkan sejumlah tertentu cuplikan dan baku pembanding untuk menghasilkan bercak residu pestisida dalam rentang 0, 1-0,5 μg . Totolkan eluat Florisil 6%, 15%, dan 50% pada lempeng KLT

yang sama. Dengan cara ini, ronnel dan ethion tidak terpisahkan;
totalkan

masing-masing baku pembanding secara terpisah. Totolkan diazinon, metil pararion, dan malation secara terpisah atau sebagai campuran.

Volume ekstrak cuplikan yang ditotolkan harus kurang atau sama dengan $10 \mu\text{l}$, dan penotolan harus dilakukan berulang-ulang dengan pipet penotol Kontes ukuran 1,2, atau $3 \mu\text{l}$. Totolkan larutan baku pembanding dan cuplikan dengan pipet yang sama. Hasil terbaik akan dicapai apabila bercak hasil totolan cuplikan dijaga supaya berukuran sekecil mungkin.

(b) Pengembangan

Setelah cuplikan dan baku pembanding ditotolkan pada lempeng KLT, persiapkan bejana pengembang KLT, 14-1.4.f. Tempatkan pelapis dan pa lung metal dalam bejana pengembang KLT. Tuangkan 50 ml metilsikloheksana, 14-1.3.d. (2), ke dalam palung metal, dan 75 ml ke dasar bejana. Isilah dengan cepat bejana pencelup, 14-1.3.d. (1), hingga kira-kira 4-5 cm dari atas bejana. Putar lempeng KLT hingga terbalik (bagian atas dibawah) dan celupkan sedemikian hingga sisi tak terlapis menyentuh dari belakang dinding pengembang KLT, untuk menghindari sisi depan lempeng KLT dari kemungkinan pengelupasan lapisan adsorben selama operasi pencelupan. Celupkan lempeng KLT hanya sampai pada garis penotolan, angkat lempeng KLT, balikkan dan segera diletakkan pada palung metal dengan bagian atas lempeng bersandar pada sisi bejana pengembang KLT. Tempatkan penutup gelas pada bejana pengembang dan tutup rapat dengan pipa penutup.

Pada saat garis depan pelarut pengembang mencapai garis akhir pengembangan, yaitu garis 10 cm di atas garis penotolan, lempeng KLT segera diangkat keluar dan tiriskan hingga kering dalam lemari asam kira-kira selama 5 menit.

(c) Penyemprotan

Segera semprotkan larutan pewarna 14-1.3.e. (2) pada lempeng KLT dengan agak kuat hingga merata, menggunakan gerakan lateral dengan posisi botol penyemprot, 14-1.4.i, tegak lurus arah aliran larutan. Setelah penyemprotan, lempeng harus berwarna biru muda. Menggunakan botol penyemprot, 14-1.4.i. lanjutkan penyemprotan lempeng di atas dengan larutan perak nitrat, 14-1.3.e.(3) tipis-tipis dan merata. Pada tahap ini lempeng KLT harus berwarna ungu kebiruan dan bercak tampak jelas.

Setelah 2 menit, lanjutkan penyemprotan lempeng KLT di atas dengan larutan asam sitrat, 14-1.3.e.(4), agak kuat hingga merata menggunakan botol penyemprot, 14-1.4.1. Setelah penyemprotan ini, pestisida tiosfat akan tampak sebagai bercak biru muda atau ungu di atas dasar kuning. Warna bercak akan mencapai intensitas maksimum dalam waktu lebih kurang 5-10 menit setelah penyemprotan dengan asam sitrat. Setelah lebih kurang 10 menit. warna dasar lempeng KLT akan mengalami perubahan dari kuning

menjadi biru kehijauan, dan menutup warna bercak. Pada tahap ini, penyemprotan kembali dengan asam sitrat akan mengembalikan warna dasar lempeng KLT menjadi kuning, dan warna bercak menjadi jelas atau lebih baik daripada keadaan semula. Evaluasi kromatogram dilakukan dalam waktu kurang dari 10 menit setelah penyemprotan ulang. Bercak biru memucat sempurna secara tak terbalikkan setelah kira-kira 30-40 menit dari saat penyemprotan asam sitrat pertama.

(d) Pemaparan

Paparkan lempeng KLT pada sinar UV hingga bercak baku pembanding dengan konsentrasi terendah tampak jelas: 5 ng untuk sebagian besar pestisida organoklor akan tampak setelah 15-20 menit pemaparan dengan menggunakan peralatan seperti diuraikan dalam 14-1.4.k. Waktu pemaparan 30 menit tidak akan mempengaruhi lempeng KLT. Hasil terbaik akan didapat bila lempeng KLT ditempatkan pada posisi 8 cm dari permukaan bawah lampu UV.

LAMPIRAN-5

METODE CEMARAN MIKROBA

(1) Uji *Escherichia coli*

Prinsip

Pertumbuhan selektif *E. coli* pada suhu 44°C menghasilkan gas dalam tabung Durham. dan reaksi biokimia terhadap pertumbuhan pada suhu 44°C tersebut.

Media Dan Pereaksi

Media

Escherichia coli Broth (ECB)

Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)

Trypton Broth/Media Indol (TB)

MR-VP Medium

Simmon's Citrate Agar (SCA)

Nutrient

Pereaksi

Pereaksi Kovacs

Larutan merah metil

Larutan alfa-naftol

Larutan kalium hidroksida

Pereaksi untuk pewarnaan Gram.

Peralatan Khusus

Tabung Durham

Tangas air 44°C

Prosedur

Dipilih biakan positif pada uji Nilai Duga Terdekat Coliform, satu ml dari masing-masing biakan tersebut diinokulasikan ke dalam ECB dan diinkubasi pada suhu 44°C selama 24-48 jam. Terbentuknya gas dalam tabung Durham menunjukkan fekal Coliform positif, kemudian biakan digoreskan pada media EMBA. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dipilih koloni warna hijau dengan kilap logam dan bintik biru kehijauan ditengahnya dari EMBA, digoreskan pada NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan pewarnaan Gram. *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif bentuk batang agak membulat. Dilanjutkan dengan penetapan IMVIC sebagai berikut:

Uji Indol

Satu sengkeli biakan murni dari NA miring diinokulasikan ke dalam beberapa tabung Trypton Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 0,2-0,3 ml pereaksi Indol (Kovacs) dan dikocok, kemudian dibiarkan selama 10

60

menit. Warna merah tua pada permukaan menunjukkan reaksi positif.
Warna jingga pada permukaan menunjukkan reaksi Indol negatif.

Uji Metil Merah

Satu sengkeli biakan murni dari NA miring diinokulasikan ke dalam MR-VP medium dan diinkubasi pada suhu 37°C selama lima hari. Ditambahkan lima tetes larutan metil merah dan dikocok. Warna merah menunjukkan reaksi positif, warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Uji Voges-Proskauer

Satu sengkeli biakan murni dari NA miring diinokulasikan ke dalam MR-VP medium dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Ditambahkan 0,6 ml larutan alfa-naftol dan 0,2 ml larutan kalium hidroksida 40%, kemudian didiamkan selama 2-4 jam. Warna merah muda hingga merah menyala menunjukkan reaksi positif. Bila tidak terjadi perubahan warna menunjukkan reaksi negatif.

Uji Citrate

Satu sengkeli biakan murni dari NA miring diinokulasikan pada Simmon's Citrate Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif.

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif dan pada reaksi IMVIC memberikan hasil seperti yang tertera pada tabel.

Hasil reaksi IMVIC beberapa bakteri

I Indol	M Metil-Merah	V Voges Proskauer	C Citrate Simmon's	Bakteri
+	+			Typical <i>Escherichia coli</i>
	+			Atypical <i>E.coli</i>
+	+		+	Intermediate Atypic?
	+		+	Intermediate Typical <i>E.</i>
		+	+	<i>aerogenes</i> Atypical <i>E.</i>
+		+	+	<i>aerogenes</i>

(2) Uji *Salmonella* sp.

Prinsip

Pertumbuhan *Salmonella* pada media pangkaya selektif, reaksi biokimia dan reaksi serologi.

Media Dan Pereaksi

Media

Lactose Broth (LB)

Tetrathionate Brilliant Green Broth (TBGB)

Selenit Cystine Broth (SCB)

Brilliant Green Aga1 (BGA)

Bismuth Sulfit Agar (BSA)
 Triple Sugar Iron Agar (TSIA)
 Lysine Iron Agar (LIA)
 Nutrient Agar (NA)

Pereaksi

Larutan Natrium klorida 0,8%
 Salmonella antisera polyvalen O.

Peralatan Khusus

Stomacher atau Blender
 Pipet ukur mulut lebar ukuran 4 ml dan 10 ml

Prosedur

Pra-pengkayaan (pre-enrichment)

Cuplikan dalam LB hasil homogenisasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24jam.

Pengkayaan selektif

Dipipet masing-masing 5 ml biakan LB ke dalam 50 ml media TBGB dan 50 ml SCB dan diinkubasi pada suhu 43°C selama 24 jam.

Isolasi

Dari masing-masing biakan TBGB dan SCB diinokulasikan 1 sengkeli pada permukaan BGA dan BSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati.

Pada BGA : Koloni dari tidak berwarna, merah muda hingga merah. dari translucent hingga keruh (opaque) dengan tingkaran merah muda hingga merah.

Pada BSA Koloni berwarna coklat abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang dengan kilap logam. Warna media disekitar koloni mula-mula berwarna coklat. jika masa inkubasi bertambah. warna koloni menjadi hitam.

Identifikasi

Dipilih 2 atau lebih koloni tersangka pada BGA dan BSA, diinokulasikan pada

TSIA, LIA dan NA dengan cara tusukan dan goresan. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Biakan diduga Salmonella positif jika :

Pada TSIA : terlihat warna merah pada permukaan agar, warna kuning pada dasar tabung dengan atau tanpa pembentukan hidrogen sulfida;

Pada LIA terlihat warna ungu; bila permukaan berwarna ungu sedangkan bagian dasar berwarna kuning, maka dianggap negatif

Uji Serologi

Diambil 1 sengkeli biakan dari NA miring dan disuspensikan dengan 1 tetes natrium klorida 0,85% pada kaca obyektif. Jika segera terjadi aglutinasi, suspensi tersebut tidak dapat dipakai. Jika tidak terjadi aglutinasi spontan, ditetaskan antisera Salmonella polivalen O pada suspensi. Kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyangkan kaca obyektif atau menggunakan sengkeli. Diamati selama 1 menit, jika terjadi aglutinasi menunjukkan uji Salmonella positif.

(3) Uji

Staphylococcus aureus

Prinsip

Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada media lempeng yang sesuai, yang mereduksi kalium telurit, menghidrolisa kuning telur dan koagulasi plasma.

Peralatan Khusus

Stomacher atau blender
Pipet ukur mulut lebar 1 dan 10 ml
Alat penghitung koloni
Batang kaca bengkok

Media Dan Pereaksi

Baird parker
Brain Heart Infusion Broth (SHIB)
Plasma kelinci
Buffered Pepton Water (BPW)
VogelJohnson(VJ)Agar

Prosedur

Disiapkan dua buah tabung yang masing-masing telah diisi dengan 9 ml BPW. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml BPW hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . dikocok. Dipipet 1 ml ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml BPW hingga diperoleh pengenceran 10^{-3} . Dari masing-masing pengenceran dipipet

0,25 ml, dituangkan pada permukaan BP Agar, disebar ratakan menggunakan batang gelas bengkok dan dibuat duplo. Dibiarkan beberapa saat hingga inokulum terserap dalam media. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dengan posisi cawan dibalik.

Setelah 24 jam dipilih cawan dengan jumlah 30-300 koloni berwarna hitam mengkilap dan dikelilingi daerah jernih. Posisi koloni diberi tanda dan inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam. Seluruh koloni yang tumbuh selama periode inkubasi dengan dri seperti di atas dihitung.

Uji Koagulase

Koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* dipindahkan ke dalam tabung berisi BHIB. diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 20-24 jam. Ke dalam 0,1 ml biakan BHIB ditambahkan 0,3 ml plasma kelinci, diinkubasi pada suhu 35-

37°C selama 4-6 jam.

Bila terjadi penggumpalan menunjukkan koagulase *Staphylococcus aureus* positif.

Perhitungan

Jumlah *Staphylococcus aureus* dipindahkan kedalam tabung berisi BHIB diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 20-24 jam. Ke dalam 0,1 ml biakan BHIB ditambahkan 0,3 ml plasma kelinci. diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 4-6 jam.

Bila terjadi penggumpalan menunjukkan koagulasi *Staphylococcus aureus* positif.

(4) Uji *Aspergillus flavus*

Prinsip

Pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* pada media yang sesuai dengan warna koloni dan bentuk morfologinya khas.

Media Dan Preaksi

Media

Potato Dextrose Agar (PDA)

Czapek Dox Agar (CDA)

Air Suling Agar 0,05%
(ASA)

Preaksi

Kloramfenikol 100 mg/liter media

Larutan laktofenol

Peralatan Khusus

Lemari bersih (Laminar Air Flow)

Mikroskop stereo

Mikroskop biasa

Blender

Cawan petri berisi kertas saring, batang gelas bengkok, kaca objek dan kaca penutup (steril).

Prosedur

Isolasi

Disiapkan 3 buah tabung yang masing-masing telah diisi 9 ml ASA. Dari hasil homogenisasi pada penyediaan contoh (menggunakan ASA sebagai pengencer), dipipet 1 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung yang berisi 9 ml ASA hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} , dikocok sampai homogen. Oibuat pengenceran

berikutnya hingga 10^{-4} . Dari tiap pengenceran dipipet 0,5 ml, disemaikan pada permukaan media lempeng POA yang mengandung kloramfenikol 100 mg/liter media dan dibuat duplo. Segera cawan petri digoyang dan diputar sedemikian rupa hingga suspensi tersebut sebar merata. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer dibuat percobaan blangko. Seluruh cawan diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 5-7 hari.

Identifikasi

Diamati adanya pertumbuhan koloni berwarna hijau kekuningan sangat cerah pada lempeng PDA. Koloni murni diinokulasikan pada PDA miring diinkubasi

pada suhu 20-25°C selama 7 hari. Biakan yang diduga *Aspergillus flavus* berwarna hijau kekuningan sangat cerah, diidentifikasi dengan cara berikut.

(i) **Mikrokultur(Slide Culture)**

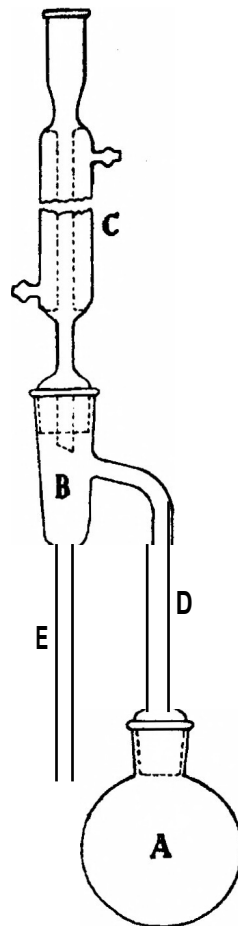
Dituang 20 ml PDA ke dalam cawan petri. Setelah memadat, diiris dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm. Diambil satu irisan media tersebut dan diletakkan pada permukaan kaca objek di dalam cawan petri. Koloni tersangka *Aspergillus flavus* ditumbuhkan pada keempat sisi irisan media, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Kertas saring di dalam cawan ditetesi air suling steril. Seluruh pekerjaan dilakukan di lemari bersih. Mikrokultur diinkubasi pada suhu 20-25°C ditumbuhkan pada keempat sisi irisan media, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Kertas saring di dalam cawan ditetesi air suling steril. Seluruh pekerjaan dilakukan di lemari bersih. Mikrokultur diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 7 hari. Setelah koloni kapang bersporulasi, konidia dan konidiaforanya akan menempel pada kaca objek dan kaca penutup. Kaca penutup diagonal dengan hati dan diletakkan pada kaca objek yang telah diberi setetes larutan laktofenol. Sediaan diamati di bawah mikroskop biasa dan dirujuk ke buku identifikasi jamur. *Aspergillus flavus* mempunyai warna konidia hijau kekuningan sangat cerah, berbentuk bulat dengan permukaan kasar bergerigi. Sterig mata uniseriat, yaitu mempunyai fialida berbentuk botot atau biseriat yaitu mempunyai fialida dan metata. Vesikula berbentuk bulat. konidiafora bergerigi dan tidak berwarna.

(ii) **Inokulasipada media lempeng (Spot Culture)**

Dengan jarum sengkelit turus *Aspergillus flavus* diinokulasikan pada CDA. Cawan petri dipegang dengan posisi terbalik dan biakan kapang diinokulasikan dengan cara tusukan dibagian tengah media. Diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 7 - 14 hari. Dibuat kontrol positif. Pengamatan dilakukan dengan atau tanpa mikroskop stereo selama masa inkubasi. Pengamatan tanpa mikroskop stereo selama masa inkubasi. Pengamatan tanpa mikroskop meliputi morfologi kapang secara keseluruhan.

Pengamatan Hasil

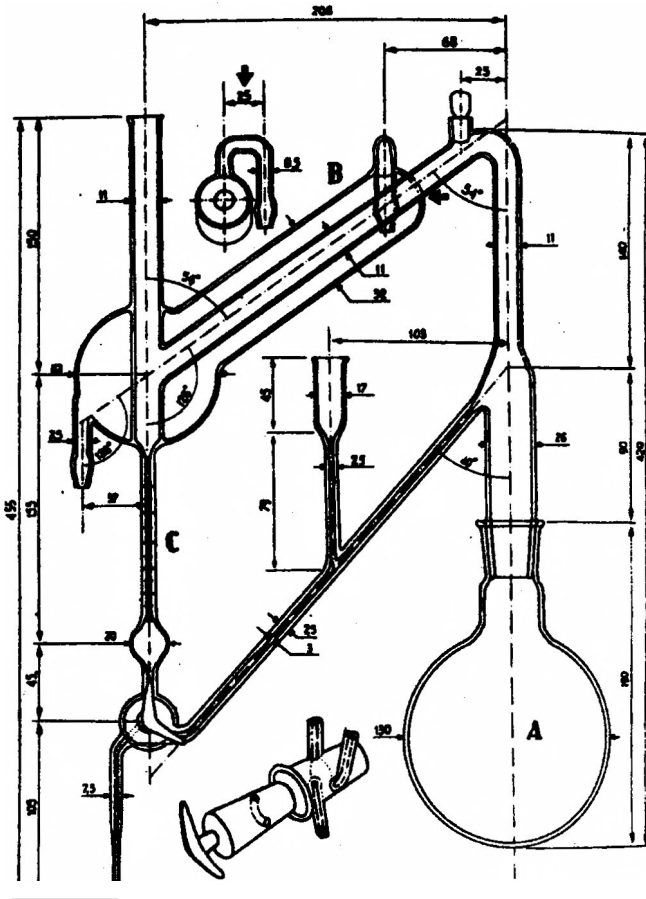
Jika diperoleh hasil seperti tersebut di atas maka dapat dinyatakan adanya *Aspergillus flavus* dalam contoh.

LAMPIRAN-7**ALAT PENETAPAN KADAR AIR (DESTILASI TOLUENA)****Keterangan gambar :**

- A. Labu 500 ml
- B. Alat penampung
- C. Pendingin air terbalik
- D. Labu tabung penyambung yang dibungkus dengan asbes
- E. Tabung penerima 5 ml berskala 0,1 ml

LAMPIRAN-7

ALAT PENETAPAN KADAR MINYAK ATSIRI



Keterangan gambar :

A. Labu bulat 1000 ml

B. Pendingin

C. Buret 0,5 ml berskala 0,01 ml

LAMPIRAN-8

TABEL BOBOT JENIS DAN KADAR ETANOL

(Lihat Farmakope Indonesia IV,
Hal. 1221 - 1223).

LAMPIRAN-9 "

DAFTAR PEREAKSI DAN LARUTAN PERCOBAAN

(Kecuali disebutkan lain, pereaksi dan larutan percobaan yang digunakan mengacu pada Farmakope Indonesia Edisi IV, 1995).