

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tanaman obat banyak sekali terdapat di alam. Dalam kehidupan sehari-hari penggunaan tanaman obat sering dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional dengan proses yang sangat sederhana. Pengobatan menggunakan tanaman obat tradisional telah diwariskan secara turun temurun oleh generasi terdahulu ke generasi berikutnya. Pengobatan tradisional merupakan salah satu upaya di luar ilmu kedokteran dan perawatan, yang dilakukan secara tradisional maupun dengan ilmu pengetahuan dan teknologi. Obat-obat tradisional telah terbukti berkhasiat sebagai obat perlu dikembangkan dan disebarluaskan kepada masyarakat sebagai perwujudan untuk mencapai derajat kesehatan yang lebih baik. Hal ini merupakan salah satu upaya mengatasi masalah kesehatan masyarakat dengan memanfaatkan tanaman obat tradisional.

Banyak sekali macam dan jenis tanaman obat di alam yang masing-masing memiliki khasiat dan kandungan senyawa tertentu yang berbeda satu sama lain. Tumbuhan merupakan salah satu sumber daya alam penting, yang memiliki nilai khusus dari segi ekonomi. Tumbuhan merupakan tempat terjadinya proses sintesis senyawa organik yang kompleks menghasilkan sederet golongan senyawa dengan berbagai macam unsur. Kandungan senyawa yang terdapat pada bahan alam (tumbuhan) dapat berupa senyawa metabolit primer dan juga senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit primer merupakan kandungan yang digunakan oleh tumbuhan sebagai penghasil energi seperti karbohidrat, protein dan lemak. Sedangkan senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan sebagai pelindung tumbuhan dari gangguan penyakit dan serangan hama. Senyawa ini dapat digolongkan dalam beberapa jenis senyawa seperti terpenoid, steroid, flavonoid dan alkaloid (Sjamsul Arifin, 1986). Senyawa metabolit sekunder digunakan untuk mempertahankan

eksistensi tumbuhan tersebut terhadap tantangan ekosistem yaitu sebagai alat pemikat (*attractant*), alat penolak (*repellant*) dan alat pelindung (*protectant*) (Sumaryono, 1999). Senyawa metabolit sekunder digunakan sebagai obat-obatan oleh masyarakat karena memiliki banyak khasiat. Senyawa metabolit sekunder banyak terdapat pada berbagai macam tumbuhan yang digunakan sebagai obat yang biasa dikenal sebagai obat tradisional.

Salah satu bahan alam yang sering digunakan sebagai bahan obat tradisional adalah kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L). Kunci pepet termasuk kerabat temu-temuan, tanaman ini masih satu genus dengan temu kunci yakni genus *Kaempferia*. Kunci pepet mempunyai batang pendek yang bercabang, sangat kuat, berwarna putih kekuningan, mempunyai daun berbentuk bundar menjorong lebar, berwarna hijau muda. Rimpang kunci pepet berwarna pucat, banyak serat dan rasanya pahit. Rimpang kunci pepet banyak sekali mengandung senyawa-senyawa yang berkhasiat bagi kesehatan tubuh. Secara tradisional biasanya rimpang kunci pepet digunakan sebagai obat sakit perut, disentri dan juga penambah nafsu makan.

Rimpang kunci pepet banyak mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya adalah saponin, sineol, minyak atsiri dan polifenol yang selama ini banyak dimanfaatkan sebagai obat antikanker, antiinflamasi dan juga sebagai imunostimulan (Kardinan dan Taryono, 2003). Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam rimpang kunci pepet berbeda-beda. Hal ini dipengaruhi oleh daerah asal kunci pepet ditanam, fraksi yang digunakan untuk mengisolasi dan waktu pengambilan kunci pepet. Ketinggian tempat dengan kondisi tanah yang berbeda kesuburannya dapat mempengaruhi komponen utama senyawa tersebut. Oleh karena itu perlu diadakan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam kunci pepet. Penelitian ini bertujuan untuk pemanfaatan kunci pepet sebagai tanaman dan obat mengetahui senyawa metabolit sekunder yang dapat diisolasi dari fraksi kloroform rimpang kunci pepet dengan metode maserasi dan mengidentifikasi senyawa tersebut menggunakan spektroskopi UV-VIS, IR, ¹H-NMR dan

^{13}C -NMR. Metode yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder pada kunci pepet adalah maserasi dengan menggunakan pelarut metanol dilanjutkan partisi dengan n-heksan kemudian dipartisi kembali dengan kloroform. Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

B. Identifikasi Masalah

Berdasarkan uraian yang dikemukakan pada latar belakang, maka dapat diidentifikasi beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada bahan alam (tumbuhan) yang dapat digunakan untuk penelitian banyak terkandung di dalam akar, daun, batang, rimpang, bunga, buah, kulit batang, biji dan kayu.
2. Terdapat berbagai metode yang dapat digunakan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder diantaranya adalah maserasi, soxhletasi, dan perkolasi.
3. Terdapat beberapa pelarut yang dapat digunakan untuk maserasi, antara lain yaitu air, metanol, etanol dan pelarut lain.
4. Terdapat berbagai metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder diantaranya, KLT, Spektroskopi UV-VIS, Spektroskopi IR, dan Spektroskopi NMR.

C. Pembatasan Masalah

Penelitian ini memiliki batasan masalah agar tidak berkembang terlalu luas. Adapun batasan masalah pada penelitian ini yaitu :

1. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang kunci pepet yang sudah dikupas, dikeringkan dan dibuat serbuk.
2. Metode yang digunakan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder pada rimpang kunci pepet dalam penelitian ini adalah maserasi.
3. Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi adalah metanol teknis.

4. Ekstrak yang diperoleh setelah proses maserasi kemudian dipartisi menggunakan pelarut n-heksan kemudian dipartisi kembali menggunakan kloroform lalu dipekatkan menggunakan evaporator.
5. Identifikasi senyawa metabolit sekunder dari hasil isolasi rimpang kunci pepet menggunakan spektroskopi UV-VIS, IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

D. Perumusan Masalah

Dari beberapa identifikasi dan pembatasan masalah, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana hasil isolasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi kloroform pada rimpang kunci pepet menggunakan metode maserasi?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder fraksi kloroform hasil isolasi pada rimpang kunci pepet secara spektroskopi UV-VIS, IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$?

E. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada rimpang kunci pepet dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol.
2. Mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dari fraksi kloroform pada rimpang kunci pepet dengan menggunakan spektroskopi UV-VIS, IR dan NMR.

F. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh melalui penelitian ini antara lain :

1. Memberikan informasi bagaimana cara mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder fraksi kloroform dari rimpang kunci pepet.
2. Mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder fraksi kloroform yang diperoleh dari hasil isolasi rimpang kunci pepet.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Deskripsi Teori

1. Kunci pepet

Kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) adalah sejenis rimpang yang masih berkerabat dekat dengan kencur. Tanaman ini memiliki banyak khasiat sebagai tanaman obat tradisional karena banyak mengandung senyawa metabolit sekunder.

Klasifikasi tanaman kunci pepet adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Kaempferia</i>
Spesies	: <i>Kaempferia rotunda</i> L



Gambar 1. Kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L).

Rimpang kunci pepet mengandung senyawa–senyawa metabolit sekunder diantaranya adalah flavonoid, alkaloid, saponin, polifenol, minyak atsiri dan senyawa metabolit sekunder lainnya sehingga sering digunakan masyarakat sebagai alternatif obat tradisional. Kunci pepet

disebut juga kunir putih. Daunnya bercorak indah dan tumbuhnya tidak tinggi. Bentuknya menyerupai tanaman hias sehingga sering ditanam di pekarangan atau di dalam pot. Kunci pepet dapat ditemukan tumbuh liar pada dataran rendah di beberapa tempat di bagian timur Jawa sampai ketinggian kurang dari 750 m dari permukaan laut. Selain digunakan sebagai campuran jamu tradisional, kunci pepet juga sering digunakan untuk kosmetika tradisional. Dua fase tumbuh kunci pepet, yaitu fase vegetatif dan generatif. Pertumbuhan normal seperti biasa dengan daun dan batang semu pada fase vegetatif, sedangkan pada fase generatif hanya terlihat bunga-bunga.

2. Senyawa Metabolit Sekunder

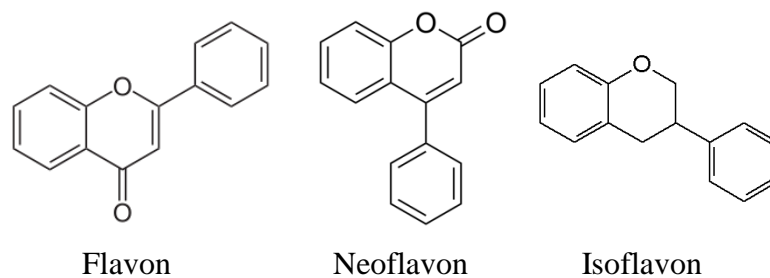
Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa yang terkandung di dalam tumbuhan sebagai pelindung dari penyakit dari gangguan hama. Senyawa metabolit sekunder adalah senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme. Masing-masing tumbuhan memiliki senyawa metabolit penyusun utama yang terkandung di dalamnya yang bahkan mungkin masing-masing spesies memiliki ciri khas yang berbeda. Senyawa kimia yang merupakan hasil metabolisme sekunder pada tumbuhan sangat beragam dan dapat diklasifikasikan dalam beberapa golongan senyawa bahan alam yaitu terpenoid, flavonoid, steroid, kumarin, alkaloid dan lain sebagainya (Sjamsul Arifin, 1986).

Sebagian besar tanaman penghasil senyawa metabolit sekunder memanfaatkan senyawa tersebut untuk mempertahankan diri dan berkompetisi dengan makhluk hidup lain di sekitarnya. Tanaman dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder (seperti: quinon, flavonoid, tanin, dll.) yang membuat tanaman lain tidak dapat tumbuh di sekitarnya. Hal ini disebut sebagai alelopati. Berbagai senyawa metabolit sekunder telah digunakan sebagai obat atau model untuk membuat obat baru, contohnya adalah aspirin yang dibuat berdasarkan asam salisilat yang

secara alami terdapat pada tumbuhan tertentu. Manfaat lain dari metabolit sekunder adalah sebagai pestisida dan insektisida, contohnya adalah rotenon dan rotenoid.

a. Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini memiliki kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana terdapat dua cincin yang terikat pada suatu rantai propana. Istilah flavonoid diberikan untuk senyawa fenol yang berasal dari kata flavon, yaitu nama dari salah satu jenis flavonoid yang terbesar jumlahnya didalam tanaman. Masing-masing senyawa flavonoid memiliki struktur tertentu yang dicirikan dengan adanya cincin benzen dan gugus fungsi oksigen pada cincin (Sovia Lenny, 2006:14). Senyawa flavonoid terdiri dari berbagai jenis tergantung dari tingkat oksidasi dari rantai propana pada sistem senyawa tersebut. Beberapa jenis struktur kerangka dari flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2 berikut ini:



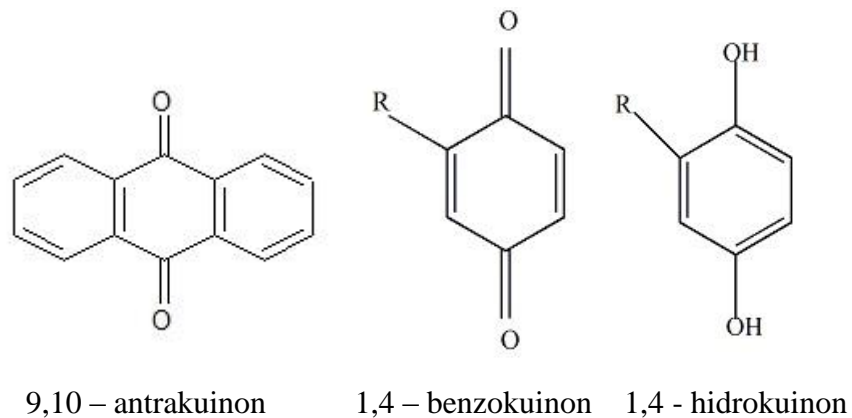
Gambar 2. Jenis struktur flavonoid

b. Kuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon, yang terdiri atas 2 gugus karbonil yang berkonjugasi dengan 2 ikatan rangkap karbon-karbon. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dapat dipilah menjadi 4 kelompok:

benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama biasanya terhidroksilasi dan bersifat senyawa fenol serta mungkin terdapat *in vivo* dalam bentuk gabungan dengan gula sebagai glikosida atau kuinol tanwarna, kadang-kadang juga bentuk dimer. Dalam hal demikian, diperlukan hidrolisis asam untuk melepaskan kuinon bebas nya. Kuinon isoprenoid terlibat dalam respirasi sel dan fotosintesis dan dengan demikian kuinon tersebar secara merata dalam tumbuhan.

Warna pigmen kuinon alam beragam, mulai dari kuning pucat sampai ke hampir hitam. Walaupun kuinon tersebar secara luas, namun perannya terhadap warna tumbuhan sangat kecil. Jadi, pigmen ini sering terdapat dalam kulit, akar, atau jaringan lain, namun warna pigmen kuinon ini tidak mendominasi. Jenis struktur dari senyawa kuinon ditunjukkan pada Gambar 3 berikut ini:



Gambar 3. Jenis struktur kuinon

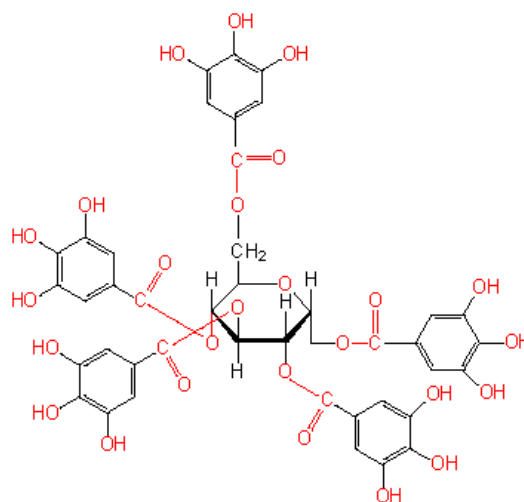
c. Epoksida

Epoksida adalah senyawa eter siklik dengan cincin yang memiliki tiga anggota. Struktur dasar dari sebuah epoksida berisi sebuah atom oksigen yang diikat pada dua atom karbon berdekatan yang berasal dari hidrokarbon. Tegangan dari cincin dengan tiga anggota ini membuat senyawa epoksida menjadi lebih reaktif daripada eter

asiklik. Senyawa epoksida merupakan senyawa yang sangat penting sama seperti produk kimia lainnya, misalnya resin. Proses produksinya yang telah diketahui adalah oksidasi senyawa olefin dengan asam, seperti asam m-klorobenzoat, asam perasetat, dll dan peroksida organik seperti tert-butyl hidroperoksida. Karakteristik dari senyawa epoksida adalah adanya gugus oksiran yang terbentuk oleh oksidasi dari senyawa olefinik atau senyawa aromatik ikatan ganda.

d. Tanin

Tanin merupakan suatu senyawa golongan yang terbesar dari senyawa kompleks yang tersebar luas pada tumbuhan. Tanin dianggap senyawa kompleks yang dibentuk dari campuran polifenol yang sangat sukar dipisahkan karena tidak dapat dikristalkan. Tanin umumnya terdapat dalam organ daun, buah, kulit batang, dan kayu. Didalam tumbuhan letak tanin terpisah dari protein dan enzim sitoplasma, tetapi bila jaringan rusak, misalnya bila hewan memakannya maka reaksi penyamakan dapat terjadi. Reaksi ini menyebabkan protein sulit diabsorpsi oleh cairan pencernaan hewan. Struktur dari senyawa tanin ditunjukkan pada Gambar 4 berikut ini:



Gambar 4. Struktur tanin

3. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode untuk mengisolasi senyawa yang terkandung pada berbagai bahan alam. Pada proses maserasi ini dilakukan dengan cara perendaman sampel dengan menggunakan pelarut organik pada temperatur ruangan. Metode ini sangat mudah dan menguntungkan karena alat-alat yang digunakan sangat sederhana dengan biaya yang relatif sangat murah. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang banyak digunakan pada proses maserasi ini karena secara umum dapat melarutkan segala golongan senyawa metabolit sekunder (Muhammad Taofik, 2010).

4. Kromatografi

Kromatografi merupakan salah satu teknik pemisahan dengan prinsip kerja menggunakan dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak, pemisahan terjadi pada gerakan relatif dari dua fasa ini. Banyak keuntungan yang dapat diperoleh menggunakan metode kromatografi. Pemisahan yang dilakukan cepat, mudah dan peralatan yang digunakan sangat sederhana. Jenis-jenis metode pada kromatografi diantaranya adalah Kromatografi Lapis Tipis, Kromatografi Vakum Cair, Kromatografi Kolom, Kromatografi Kolom Gravitasi dan lain sebagainya.

a. Kromatografi Vakum Cair (KVC)

Fraksinasi merupakan proses pemisahan komponen-komponen dalam ekstrak berdasarkan perbedaan tingkat kepolarannya. Salah satu metode yang dapat digunakan dalam fraksinasi adalah Kromatografi Vakum Cair (KVC). Keuntungan KVC dibandingkan dengan kromatografi konvensional terletak pada jumlah fase gerak yang

digunakan. Pada KVC, konsumsi fase gerak hanya 80% atau lebih sedikit dibandingkan dengan kromatografi konvensional, sedangkan kekurangan metode ini adalah membutuhkan waktu yang cukup lama (Hostettmann *et al.*, 1997). Kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kemasan rapat yang maksimal, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap lalu divakum kembali. Kolom dihisap sampai kering dan siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, mulai pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolarannya ditingkatkan perlahan-lahan.

Kromatografi cair vakum atau *vacuum liquid chromatography* (VLC) pertama kali diperkenalkan oleh Coll pada tahun 1977. Kromatografi vakum cair menggunakan silika gel 60 (63-200 μm , Merck®). Kolom kromatografi dikemas kering (biasanya dengan penyerap mutu 10-40 μm , Merck®) dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap lalu divakumkan lagi (Hostettmann *et al.*, 1997). Teknik ini berdasarkan pertimbangan pada kromatografi lapis tipis preparatif yang dijalankan dalam bentuk kolom kromatografi dengan menggunakan vakum untuk mempercepat aliran eluen. Ini berbeda dengan *flash chromatography*, dalam kolom VLC dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi kemudian dikeringkan dan dilusi kembali dengan eluen yang lebih polar (Hostettmann *et al.*, 1997).

Prinsip kerja dari Kromatografi Vakum Cair (KVC) adalah adsorpsi atau serapan, sedangkan pemisahannya didasarkan pada senyawa-senyawa yang akan dipisahkan terdistribusi di antara fasa diam dan fasa gerak dalam perbandingan yang berbeda-beda (Hardjono Sastrohamidjojo, 1985 : 6-9). Prosedur kerja KVC menggunakan alat bantu yang berupa pompa vakum untuk mempercepat laju alir fasa gerak selama proses pemindahan zat terlarut. Kolom kromatografi dikemas kering (biasanya dengan penyerap mutu KLT 10-40 μm) dalam keadaan

vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Pompa vakum dihentikan dan pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan kembali. Kolom dihisap sampai kering dan telah siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolarannya ditingkatkan perlahan-lahan. Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Oleh karena itu, kromatografi vakum cair menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak (Hostettmann K., Hostettmann M., dan Marston A., 1986: 33-34).

b. Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Kromatografi kolom termasuk kromatografi serapan yang sering disebut kromatografi elusi, karena senyawa yang akan terpisah akan terelusi dari kolom. Kolom kromatografi dapat berupa pipa gelas yang dilengkapi dengan kran dan gelas penyaring di dalamnya. Ukuran kolom tergantung pada banyaknya zat yang akan dipisahkan. Untuk menahan penyerap yang diletakkan di dalam kolom dapat digunakan glass wool atau kapas (Hardjono S., 1985 : 6). Kromatografi kolom dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada prinsipnya hampir sama. Apabila suatu cuplikan merupakan campuran beberapa komponen dimasukkan melalui bagian atas kolom, maka komponen yang diserap lemah oleh adsorben akan keluar lebih cepat bersama eluen, sedangkan komponen yang diserap kuat akan keluar lebih lama. Zat-zat aktif yang digunakan sebagai penyerap dalam kromatografi kolom merupakan katalisator yang baik. Alumina, terutama bila bersifat alkali, sering menyebabkan perubahan kimia dan menimbulkan reaksi-reaksi, sebagai contoh dapat menyebabkan kondensasi dari aldehida-aldehida dan keton-keton, sehingga bila hal ini terjadi maka harus menggunakan alumina yang bersifat netral. Silika gel dapat menyebabkan isomerisasi dari berbagai senyawa-senyawa seperti terpen dan sterol.

c. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Istilah kromatografi berasal dari kata latin *chroma* berarti warna dan *graphien* berarti menulis. Kromatografi pertama kali diperkenalkan oleh Michael Tsweet pada tahun 1903 seorang ahli botani dari Rusia. Michael Tsweet dalam percobaannya berhasil memisahkan klorofil dan pigmen-pigmen warna lain dalam ekstrak tumbuhan dengan menggunakan serbuk kalsium karbonat yang diisikan ke dalam kolom kaca dan petroleum eter sebagai pelarut. Proses pemisahan itu diawali dengan menempatkan larutan cuplikan pada permukaan atas kalsium karbonat, kemudian dialirkan pelarut petroleum eter. Hasilnya berupa pita-pita berwarna yang terlihat sepanjang kolom sebagai hasil pemisahan komponen-komponen dalam ekstrak tumbuhan (Alimin, 2007:73).

Semua kromatografi memiliki fase diam (dapat berupa padatan, atau kombinasi cairan-padatan) dan fase gerak (berupa cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda. Pelaksanaan kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Silika gel (atau alumina) merupakan fase diam. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis seringkali juga mengandung senyawa yang dapat berpendar dalam sinar ultra violet. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai (Clark, 2007).

Kromatografi lapis tipis dikembangkan tahun 1938 oleh Ismailoff dan Schraiber. Adsorben dilapiskan pada lempeng kaca yang bertindak sebagai penunjang fase diam. Fase bergerak akan merayap sepanjang fase diam dan terbentuklah kromatogram, ini dikenal juga sebagai kromatografi kolom terbuka. Metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan, dan sensitif. Kecepatan pemisahan tinggi dan mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan. Biasanya yang

sering digunakan sebagai materi pelapisnya adalah silika gel, tetapi kadang kala bubuk selulosa dan tanah diatome juga dapat digunakan. Fase diam hidrofilik dapat menggunakan pengikat seperti semen, kanji, disperse koloid plastik, silika terhidrasi. Untuk meratakan pengikat dan zat pada pengadsorpsi digunakan suatu aplikator.

Pemilihan sistem pelarut dan komposisi lapis tipis ditentukan oleh prinsip kromatografi yang akan digunakan. Pada penetesan sampel yang akan dipisahkan digunakan suatu *micro-syringe* (penyuntik berukuran mikro). Sampel ditetaskan pada salah satu bagian tepi pelat kromatografi (sebanyak 0,01 – 10 µg zat). Pelarut harus nonpolar dan mudah menguap. Kolom-kolom dalam pelat dapat diciptakan dengan mengerok lapisan vertikal searah gerakan pelarut. Teknik *ascending* digunakan untuk pemisahan yang dilakukan pada temperatur kamar, sampai permukaan pelarut mencapai tinggi 15 – 18 cm. Waktu yang diperlukan antara 20 – 40 menit. Semua teknik yang digunakan untuk kromatografi kertas dapat dipakai juga untuk kromatografi lapis tipis. Resolusi KLT jauh lebih tinggi dari pada kromatografi kertas karena laju difusi yang luar biasa kecilnya pada lapisan pengadsorpsi (Khopkar, 2008: 164). Zat-zat berwarna dapat terlihat langsung, tetapi dapat juga digunakan *reagent* penyemprot untuk dapat melihat bercak suatu zat. Asam kromat sering digunakan untuk zat organik. Demikian juga penandaan secara radiokimia juga dapat digunakan, untuk menempatkan posisi suatu zat, reagent dapat juga disemprotkan pada bagian tipis saja. Bagian yang lainnya dapat diperoleh kembali tanpa pengotoran dari reagent dengan pengerokan setelah pemisahan selesai (Khopkar, 2008: 164 – 165).

Jarak antara jalannya pelarut bersifat relatif. Oleh karena itu, diperlukan suatu perhitungan tertentu untuk memastikan spot yang terbentuk memiliki jarak yang sama walaupun ukuran jarak plat nya berbeda. Nilai perhitungan tersebut adalah nilai R_f , nilai ini digunakan sebagai nilai perbandingan relatif antar sampel. Nilai R_f juga menyatakan

derajat retensi suatu komponen dalam fase diam sehingga nilai R_f sering juga disebut faktor retensi. Nilai R_f dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Semakin besar nilai R_f dari sampel maka semakin besar pula jarak Bergeraknya senyawa tersebut pada plat kromatografi lapis tipis. Saat membandingkan dua sampel yang berbeda di bawah kondisi kromatografi yang sama, nilai R_f akan besar bila senyawa tersebut kurang polar dan berinteraksi dengan adsorben polar dari plat kromatografi lapis tipis. Nilai R_f dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Bila identifikasi nilai R_f memiliki nilai yang sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki karakteristik yang sama sedangkan, bila nilai R_f berbeda, senyawa tersebut dapat dikatakan senyawa yang berbeda.

5. Spektroskopi

Spektroskopi merupakan ilmu terapan yang mempelajari materi dan komponennya berdasarkan cahaya, atau partikel yang dipantulkan, diserap atau dipancarkan oleh materi tersebut. Spektroskopi juga sebagai ilmu yang mempelajari interaksi antara cahaya dan materi. Spektroskopi digunakan untuk menganalisa data secara kualitatif maupun kuantitatif. Dalam masa modern definisi spektroskopi berkembang seiring teknik-teknik baru yang dikembangkan untuk memanfaatkan hal-hal lain yang berkaitan seperti cahaya tampak, dan juga radiasi elektromagnetik dan non-elektromagnetik seperti gelombang mikro, gelombang radio, elektron, foton, gelombang suara, sinar X dan lain sebagainya.

Spektroskopi biasanya digunakan dalam berbagai bidang kimia untuk mengidentifikasi suatu senyawa melalui spektrum yang dipancarkan atau diserap. Alat yang digunakan untuk merekam data

spektrum biasa disebut spektrometer. Spektroskopi juga digunakan secara intensif dalam astronomi dan penginderaan jarak jauh. Kebanyakan pada teleskop–teleskop besar mempunyai spektrograf yang digunakan dalam mengukur komposisi kimia dan atribut fisik lainnya dari suatu objek astronomi atau untuk mengukur kecepatan objek astronomi atau untuk mengukur kecepatan objek astronomi berdasarkan pegeseran Doppler garis–garis spektral. Jenis–jenis Spektroskopi antara lain Spektroskopi UV-VIS, Spektroskopi IR dan Spektroskopi NMR.

a. Spektroskopi UV - Vis

Analisis Spektroskopi ini didasarkan pada interaksi radiasi dengan spesies kimia. Berprinsip pada penggunaan cahaya/tenaga magnet atau listrik untuk mempengaruhi senyawa kimia sehingga menimbulkan respon. Respon tersebut dapat diukur untuk menentukan jumlah atau jenis senyawa. Cara interaksi dengan suatu sampel dapat dengan absorpsi, pemendaran (*luminescence*) emisi, dan penghamburan (*scattering*) tergantung pada sifat materi. Teknik spektroskopi meliputi spektroskopi UV-Vis, spektroskopi serapan atom, spektroskopi infra merah, spektroskopi fluorensi, spektroskopi NMR, spektroskopi massa. Spektroskopi UV-Vis merupakan teknik spektroskopi pada daerah ultra violet dan sinar tampak. Dari spektrum absorpsi dapat diketahui panjang gelombang dengan absorbansi maksimum dari suatu unsur atau senyawa. Contoh : Analisis protein, asam amino, kinetika enzim. Pada prinsipnya spektroskopi UV-Vis menggunakan cahaya sebagai tenaga yang mempengaruhi senyawa kimia sehingga menimbulkan cahaya. Cahaya yang digunakan merupakan foton yang bergetar dan menjalar secara lurus dan merupakan tenaga listrik dan magnet yang keduanya saling tagak lurus.

Tenaga foton bila mmepengaruhi senyawa kimia, maka akan menimbulkan respon, sedangkan respon yang timbul untuk senyawa organik ini hanya respon fisika atau *physical event*. Tetapi bila sampai

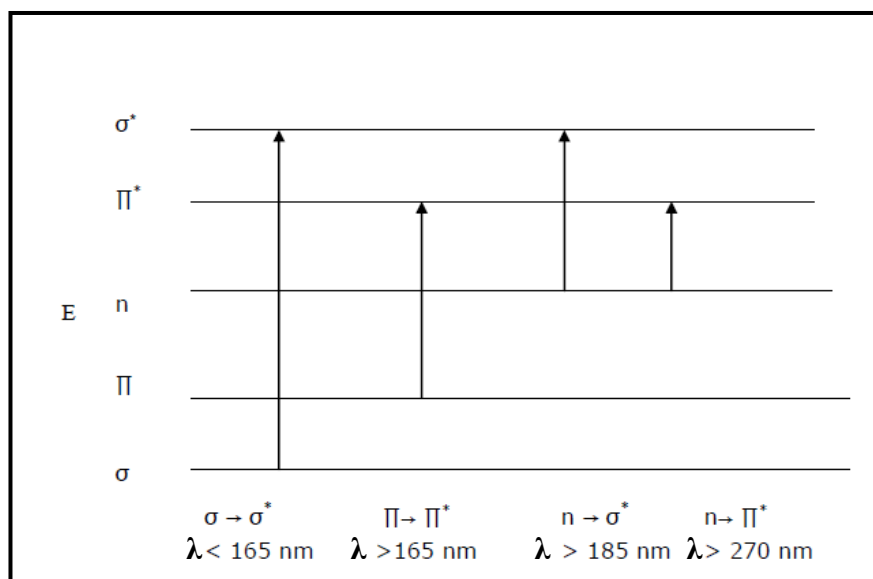
menguraikan senyawa kimia maka dapat terjadi peruraian senyawa tersebut menjadi molekul yang lebih kecil atau hanya menjadi radikal yang dinamakan peristiwa kimia atau *chemical event*.

Spektroskopi UV-Vis digunakan untuk cairan berwarna. Sehingga sampel yang akan diidentifikasi harus diubah dalam senyawa kompleks. Spektra elektronik senyawa dalam fasa uap kadang-kadang menunjukkan struktur halus vibrasi yang dapat teramati, namun dalam fasa-fasa mampat, tingkat energi molekul demikian terganggu oleh tetangga-tetangga dekatnya, sehingga sering kali hanya tampak pita lebar. Semua molekul dapat menyerap radiasi dalam daerah UV-Vis karena mereka mengandung elektron yang dapat dieksitasikan ke tingkat energi yang lebih tinggi. Panjang gelombang pada absorpsi akan terjadi bergantung pada kekuatan elektron terikat dalam molekul.

Elektron dalam suatu ikatan kovalen tunggal terikat dengan kuat, dan diperlukan radiasi berenergi tinggi atau panjang gelombang pendek, untuk eksitasinya. Misalnya, alkana, yang hanya mengandung ikatan tunggal C-H dan C-C tidak menunjukkan serapan di atas 160 nm. Metana menunjukkan suatu puncak pada 122 nm yang ditandai sebagai transisi $\sigma\text{-}\sigma^*$. Ini berarti bahwa suatu elektron dalam orbital ikatan (*bonding*) sigma dieksitasikan ke orbital anti ikatan (*antibonding*) sigma. Jika suatu molekul mengandung sebuah atom seperti klor yang mempunyai pasangan elektron menyendiri, sebuah elektron tak terikat (*nonbonding*) dapat dieksitasikan ke tingkat energi yang lebih tinggi. Karena elektron *nonbonding* tak terikat terlalu kuat seperti elektron *bonding* sigma, maka absorpsinya terjadi pada panjang gelombang yang lebih panjang.

Elektron dalam ikatan rangkap dan ganda tiga agak mudah dieksitasikan ke orbital yang lebih tinggi. Suatu transisi dilambangkan dengan $\pi\text{-}\pi^*$ bila sebuah elektron pi ditingkatkan dari suatu orbital *bonding*-pi ke suatu orbital *antibonding*-pi. Penyerapan energi dalam transisi semacam itu biasanya lebih intensif daripada dalam transisi $\sigma\text{-}\sigma^*$.

Dalam molekul terkonjugasi (yaitu molekul yang memiliki ikatan-ikatan rangkap berselang seling dengan ikatan tunggal absorpsi bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang. Transisi elektronik dari sinar UV-Vis terangkum pada Gambar 5 berikut ini:



Gambar 5. Transisi Elektronik oleh sinar UV - Vis

Sistem (gugus atom) yang menyebabkan terjadinya absorpsi cahaya disebut kromofor. Kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ialah sistem yang mempunyai elektron pada orbital molekul σ . Senyawa yang hanya mempunyai orbital molekul σ ialah molekul organik jenuh yang tidak mempunyai atom dengan pasangan elektron bebas, seperti C-C dan C-H. Kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi $n \rightarrow \sigma^*$ ialah sistem yang mempunyai elektron pada orbital molekul tak mengikat (n) dan σ . Senyawa yang hanya mempunyai orbital molekul n dan σ ialah molekul organik jenuh yang mempunyai satu atau lebih atom dengan pasangan elektron sunyi, seperti C-O; C-S; C-N; C-Cl.

Kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ ialah sistem yang mempunyai elektron pada orbital molekul π . Senyawa yang

hanya mempunyai orbital molekul π , seperti $C=C$; $C\equiv C$. Kromofor yang menyebabkan transisi $n \rightarrow \pi^*$; $\pi \rightarrow \pi^*$; dan $n \rightarrow \sigma^*$ adalah sistem yang mempunyai elektron baik pada orbital molekul tak mengikat (bebas) maupun pada π .

Senyawa yang mempunyai orbital molekul n maupun π ialah senyawa yang mengandung atom yang mempunyai pasangan elektron sunyi dan orbital π atau atom yang mempunyai pasangan elektron sunyi terkonjugasi dengan atom lain yang mempunyai orbital π . Contoh jenis kromofor tersebut adalah $C=O$ dan $C=C$. Pada umumnya, senyawa yang hanya mempunyai transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$ mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang sekitar 150 nm, sedangkan senyawa yang mempunyai transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$ (disebabkan oleh kromofor tak terkonjugasi) mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang sekitar 200 nm. Senyawa yang mempunyai transisi $n \rightarrow \pi^*$ mengabsorpsi cahaya di daerah ultraviolet kuarsa (200 -400 nm). Daerah ultraviolet vakum (daerah di bawah 200 nm) merupakan daerah yang sukar memperoleh spektrum dan informasi yang dapat diperoleh mengenai struktur molekul organik sangat sedikit.

Intensitas absorpsi yang disebabkan oleh jenis transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ selalu lebih kuat 10 – 100 kali intensitas absorpsi yang disebabkan oleh jenis transisi $n \rightarrow \pi^*$ atau $n \rightarrow \sigma^*$. Spektrum senyawa yang mempunyai baik transisi $n \rightarrow \sigma^*$ maupun $\pi \rightarrow \pi^*$ terlihat seperti pada Gambar 5. Posisi absorpsi maksimum setiap pita (disebut λ maks) sesuai dengan panjang gelombang cahaya yang diperlukan supaya terjadi transisi.

b. Spektroskopi IR

Spektroskopi *Infra Red* (IR) digunakan untuk menentukan struktur, khususnya senyawa organik dan juga untuk analisis kuantitatif, seperti analisis kuantitatif untuk pencemar udara, misalnya karbon monoksida dalam udara dengan teknik *non-dispersive*. Bila dibandingkan

dengan daerah UV- tampak, di mana energi dalam daerah ini dibutuhkan untuk transisi elektronik, maka radiasi infra merah hanya terbatas pada perubahan energi setingkat molekul. Untuk tingkat molekul, perbedaan dalam keadaan vibrasi dan rotasi digunakan untuk mengabsorpsi sinar infra merah. Jadi untuk dapat mengabsorpsi, molekul harus memiliki perubahan momen dipol sebagai akibat dari vibrasi. Berarti radiasi medan listrik yang berubah-ubah akan berinteraksi dengan molekul dan akan menyebabkan perubahan amplitudo salah satu gerakan molekul. Daerah radiasi spektroskopi IR berkisar pada bilangan gelombang $12800 \cdot 10^{-4}$ cm. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Derawi, Darfizzi (2013) tentang senyawa epoksida diperoleh karakteristik senyawa epoksida pada spektroskopi IR dengan adanya serapan pada panjang gelombang seperti ditunjukkan pada Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Serapan gugus fungsi senyawa Epoksida pada Spektroskopi IR

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus fungsi
3400 – 3300	O-H hydrogen
2840	C – H Alkana
1745	C=O ester
1465 – 1375	C = C Aromatik
1300 – 1000	C-O ester
844	Gelang Oksirana

c. Spektroskopi NMR

Sesuai namanya NMR (*nuclear magnetic resonance*, resonansi magnetik inti). Spektroskopi NMR berhubungan dengan karakter inti dari suatu atom dalam suatu molekul yang dianalisis. Pada dasarnya

spektrometri NMR merupakan bentuk lain dari spektroskopi absorpsi sama halnya dengan UV-VIS dan IR.

Spektroskopi NMR sangat penting artinya dalam analisis kualitatif, khususnya dalam penentuan struktur molekul zat organik. Lebih tepatnya letak suatu atom dalam molekulnya. Seperti yang diketahui semua inti atom bermuatan karena mengandung proton dan juga mempunyai spin inti. Sifat inti atom dan karakter spinnya menyebabkan beberapa inti bersifat magnet. Perputaran elektron pada porosnya (spin) menyebabkan dihasilkan momen dipol magnet. Perilaku dipol magnetik ini dicirikan oleh bilangan kuantum spin inti magnet yang dinyatakan atau diberi simbol I . Apabila inti diletakkan pada suatu medan magnet (medan magnet eksternal) maka akan terjadi interaksi inti dengan magnet eksternal tersebut. Interaksinya tergantung pada jenis inti yang berinteraksi. Berikut merupakan kriteria penggunaan medan magnet pada spektroskopi NMR:

1. Medan magnet harus kuat, karena kepekaan spektroskopi NMR makin tinggi seiring meningkatnya kekuatan medan magnet.
2. Medan magnet harus cukup homogen terhadap semua sampel yang dianalisis. Apabila medan magnet tidak homogen akan menghasilkan pita-pita yang melebar dan terjadi distorsi sinyal.
3. Medan magnet harus sangat stabil, supaya analisis akurat dari detik ke detik bahkan hingga orde jam.

Prinsip dalam spektrometri NMR yaitu bila sampel yang mengandung ^1H atau ^{13}C (bahkan semua senyawa organik) ditempatkan dalam medan magnet, akan timbul interaksi antara medan magnet luar tadi dengan magnet kecil (inti). Karena adanya interaksi ini, magnet kecil akan terbagi atas dua tingkat energi (tingkat yang sedikit agak lebih stabil (+) dan keadaan yang kurang stabil (-) yang energinya berbeda. Karena inti merupakan materi mikroskopik, maka energi yang berkaitan dengan inti ini terkuantisasi, artinya tidak kontinyu. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Derawi, Darfizzi (2013) tentang senyawa epoksida

diperoleh karakteristik senyawa epoksida pada spektroskopi NMR dengan adanya pergeseran kimia pada spektrum NMR seperti ditunjukkan pada Tabel 2 berikut ini:

Tabel 2. Pergeseran Kimia pada Spektroskopi NMR senyawa Epoksida

Spektroskopi NMR	Pergeseran Kimia (δ)	Jenis Ikatan
^1H NMR	2,9 ppm	Gelang Oksirina H-C-O-C-H
^{13}C NMR	57,54 ppm	Gelang Oksirina C-O-C

B. Penelitian yang Relevan

Sri Budi Sulianti dan Sofnie (2005) telah melakukan penelitian tentang Perbandingan Komposisi Kimia Minyak Atsiri Dua Jenis Kunci Pepet (*Kaempferia rotunda* dan *Kaempferia angustifolia*). Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa kunci pepet dengan jenis *Kaempferia rotunda* memiliki 2 senyawa komponen utama yaitu Siklopropazulen dan Benzil Benzoat.

Monica Widyawati (2002) telah melakukan penelitian tentang Penentuan kadar kurkuminoid dari ekstrak kunci pepet (*Kaempferia angustifolia*) secara densitometri. Pada penelitian ini telah dilakukan analisis kurkuminoid dari kunci pepet dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel. Larutan campuran kloroform : etanol 96% : asam asetat glasial (94 : 5 : 1) digunakan sebagai fase gerak. Identifikasi noda digunakan dengan sinar ultraviolet dan sinar tampak sedangkan analisis kuantitatif menggunakan TLC Scanner pada panjang gelombang 430 nm. Diperoleh hasil bahwa kunci pepet hanya mengandung satu senyawa kurkuminoid yaitu desmetoksi-kurkuminoid dengan kadar 1,09%.

Ilmiyah Jayanti (2006) telah melakukan penelitian tentang Efektifitas berbagai konsentrasi infus rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara in vitro. Pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi dari ekstrak rimpang kunci pepet sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Hasil pada penelitian ini bahwa kunci pepet efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara in vitro karena mengandung senyawa antimikroba.

C. Kerangka Berpikir

Rimpang kunci pepet banyak mengandung senyawa metabolit sekunder sehingga banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai obat tradisional. Bagian dari kunci pepet yang digunakan sebagai obat antara lain adalah akar, umbi akar, rimpang dan daun. Pemanfaatan kunci pepet biasanya digunakan sebagai obat maag, perangsang nafsu makan, diare, pendarahan dan antiinflamasi. Selain itu kunci pepet banyak dimanfaatkan sebagai antiinfeksi, kosmetik dan insektisida. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa di dalam kunci pepet terkandung senyawa metabolit sekunder diantaranya adalah saponin, sineol, dan polifenol yang selama ini banyak dimanfaatkan sebagai obat antikanker dan imunostimulan.

Maka dari itu perlu dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya dengan metode isolasi. Sehingga dapat diketahui struktur dari senyawa yang terkandung didalam fraksi kloroform rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda*).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) dalam bentuk simplisia dari Merapi Farma Yogyakarta dan rimpang kunci pepet segar dari pasar tradisional Kota Gede Yogyakarta yang diidentifikasi di laboratorium sistematik tumbuhan Fakultas Biologi UGM.

B. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada rimpang kunci pepet dalam fraksi kloroform.

C. Alat dan Bahan

1. Alat :

- a. Spektroskopi UV-VIS
- b. Spektroskopi IR
- c. Spektroskopi ^1H – NMR
- d. Spektroskopi ^{13}C – NMR
- e. Rangkaian alat evaporasi
- f. Rangkaian alat destilasi
- g. Timbangan analitik
- h. Kolom kromatografi
- i. Corong pemisah
- j. Kertas saring
- k. Corong biasa
- l. Bejana
- m. Botol semprot
- n. Pipet volum 1, 2 dan 5 mL
- o. Plat KLT
- p. Erlenmeyer

- q. Botol vialon
- r. Alat penyaring
- s. Bekker glass

2. Bahan :

- a. Serbuk rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L)
- b. Metanol teknis
- c. Kloroform Pa
- d. n-Heksan teknis terdestilasi
- e. Etil asetat teknis terdestilasi
- f. Aseton teknis terdestilasi
- g. Serbuk silika gel
- h. Aquades
- i. Kapas

D. Prosedur Penelitian

1. Persiapan alat dan bahan

Mempersiapkan segala alat dan bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini.

2. Pengumpulan bahan

Rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) yang digunakan pada penelitian ini yaitu dalam bentuk simplisia yang diperoleh dari Merapi Farma Yogyakarta sebanyak 6 kg yang dihaluskan hingga berbentuk serbuk. Sampel serbuk yang diperoleh sebanyak 5,2 kg. Selain itu juga menggunakan rimpang segar yang diperoleh dari pasar tradisional Kota Gede Yogyakarta sebanyak 7 kg. Rimpang segar selanjutnya dikupas dan dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Selanjutnya sampel diiris tipis dan dikeringkan. Sampel kering selanjutnya dihaluskan menjadi serbuk dan diperoleh sampel sebanyak 1,4 kg.

3. Ekstraksi dan Partisi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk kunci pepet sebanyak 5,2 kg dari simplisia Merapi Farma dan 1,4 kg dari pasar tradisional Kota Gede Yogyakarta masing-masing dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol teknis sampai sampel terendam seluruhnya selama 24 jam di dalam bejana pada suhu kamar. Hasil rendaman kemudian disaring menggunakan penyaring hingga diperoleh filtrat (ekstrak metanol). Residu dari hasil penyaringan direndam kembali menggunakan metanol teknis hingga 3 kali pengulangan.

Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dikumpulkan dan diuapkan dengan menggunakan evaporator buchii sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak metanol pekat yang diperoleh selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksan teknis terdestilasi. Senyawa larut metanol dipisahkan dan dipartisi kembali dengan pelarut kloroform. Perbandingan volume ekstrak metanol dan pelarut dalam proses partisi ini adalah 1:1. Senyawa larut kloroform yang diperoleh selanjutnya dievaporasi sehingga dihasilkan fraksi kloroform pekat. Fraksi kloroform pekat yang dihasilkan merupakan fraksi yang digunakan dalam proses pemisahan dan pemurnian senyawa.

4. Impregnasi

Seluruh ekstrak kloroform pekat hasil partisi kemudian diimpregnasi terlebih dahulu sebelum dipisahkan secara Kromatografi Vakum Cair (KVC). Ekstrak kloroform pekat dilarutkan dengan pelarut aseton teknis terdestilasi, lalu diteteskan kedalam serbuk silika gel merk 60 (30-70 Mesh) dengan perbandingan berat sampel : silika gel sebesar 2:1 sambil diaduk-aduk dan diangin-anginkan sampai silika kering.

5. Kromatografi Vakum Cair (KVC)

Pada proses KVC digunakan kolom yang berdiameter 10 cm. Preparasi kolom dilakukan dengan menempatkan silika gel sebagai fasa

diam kedalam kolom sampai 2/3 bagian kolom terpenuhi. Ekstrak kloroform pekat yang telah ditimbang, dilarutkan ke dalam aseton dan diimpregnasi atau diadsorbsikan pada silika gel dengan perbandingan antara silika gel : ekstrak kloroform sebesar 1 : 1. Sampel tersebut dikeringkan terlebih dahulu hingga teradsorbsi sempurna kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan menggunakan corong pisah secara merata.

Sampel yang sudah siap kemudian dialiri dengan campuran eluen antara n-heksana : kloroform dengan perbandingan yang ditingkatkan sesuai kenaikan kepolarannya. Aliran eluen ini dipercepat lajunya menggunakan pompa vakum. Hasil dari proses KVC tersebut kemudian ditampung ke dalam botol-botol fraksi berdasarkan eluen yang digunakan. Masing-masing fraksi diidentifikasi menggunakan KLT kemudian dikelompokkan menjadi fraksi-fraksi yang memiliki jumlah noda dan Rf yang sama. Kelompok fraksi yang hampir murni akan dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan teknik Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Eluen yang digunakan pada proses KVC terangkum pada Tabel 3 berikut:

Tabel 3. Eluen yang digunakan dengan berbagai perbandingan dalam proses pemisahan KVC

Eluen	Perbandingan Eluen (v/v)	Volume (mL)
n-Heksan 100%		3 x 200
n-Heksan : Etil Asetat	9 : 1	4 x 200
	8 : 2	4 x 200
	7 : 3	3 x 200
	6 : 4	3 x 200
	1 : 1	2 x 200
Etil Asetat 100%		2 x 200
Aseton		2 x 200

6. Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Sebelum proses pemisahan secara KKG, dilakukan penentuan eluen yang tepat untuk Kromatografi Kolom Gravitasi dengan menggunakan KLT *secara trial and error*. Eluen yang tepat ditandai dengan harga Rf yang rendah dan jarak antar noda tidak terlalu dekat. Setelah itu menyiapkan bahan yang akan digunakan yaitu silika gel yang telah dipanaskan pada suhu 110° C selama 1 jam untuk diaktifkan.

Setelah itu membuat bubur silika gel dengan menambahkan eluen yang tepat pada silika gel yang telah dingin dan diaduk hingga homogen, lalu dimasukkan kedalam kolom kromatografi secara perlahan. Ekstrak kloroform pekat dilarutkan kedalam aseton dan diimpregnasi pada silika gel dan dikeringkan hingga teradsorpsi sempurna, kemudian dimasukkan kedalam kolom dengan menggunakan corong secara merata.

Mengalirkan eluen sedikit demi sedikit dengan mengatur kecepatan tetesan. Kemudian menyiapkan botol kecil untuk menampung zat yang terelusi masing-masing 5 – 10 mL dan mengidentifikasi masing-masing fraksi dengan KLT dan mengelompokkannya berdasarkan Rf yang sama kemudian dikeringkan menggunakan evaporator.

7. Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi hasil pemisahan dengan KKG ditotolkan pada plat KLT sekitar 8 – 10 mm dari salah satu ujung plat menggunakan mikropipet berujung runcing. Setelah itu plat diletakkan ke dalam chamber yang berisi eluen pada proses KVC yang kepolarannya dinaikkan. Setelah itu menentukan nilai Rf pada hasil KLT.

8. Uji Kemurnian

Fraksi yang telah menunjukkan satu noda tanpa ekor diuji kemurniannya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan berbagai macam eluen yang berbeda-beda, yaitu eluen etil asetat :

kloroform dengan perbandingan 8:2, n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8:2 dan 6:4

9. Analisis Spektroskopi

Menganalisis secara spektroskopi UV-VIS, IR, dan NMR pada fraksi yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang dominan dan kemurnian tinggi yang ditandai dengan jumlah yang banyak dan menghasilkan satu noda pada proses KLT.

10. Analisis dan Elusidasi data Spektroskopi

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis data spektra UV-VIS, IR dan NMR dari senyawa hasil isolasi. Kemudian menentukan struktur dari senyawa tersebut.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) dengan pemisahan menggunakan Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), dan kemurnian secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi kloroform rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) menggunakan spektrometer UV-Vis, IR, H^1 -NMR, C^{13} -NMR HSQC dan HMBC.

1. Hasil Pemisahan dengan Maserasi dan Partisi

Hasil dari pemisahan dengan maserasi dan partisi pada rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) terangkum pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pemisahan dengan Maserasi dan Partisi

Keterangan	Hasil Pengamatan
Bahan Rimpang Kunci Pepet	Bentuk Serbuk rimpang kunci pepet 6,6 kg
Pelarut pada Maserasi	Metanol teknis
Volume Hasil Maserasi	Ekstrak Metanol 14 L
Warna Ekstrak Metanol Hasil Maserasi	Kuning Kecoklatan
Volume Ekstrak Pekat Metanol	Ekstrak Pekat Metanol 721 mL
Pelarut untuk Partisi	Kloroform Pa
Volume Ekstrak Kloroform Hasil Partisi	Ekstrak Kloroform 720 mL
Warna Ekstrak Kloroform Hasil Partisi	Coklat kemerahan
Volume Ekstrak Pekat Kloroform	Ekstrak Pekat Kloroform 158 mL

2. Hasil Pemisahan Ekstrak Kloroform dengan KVC, KKG dan KLT pemurnian.

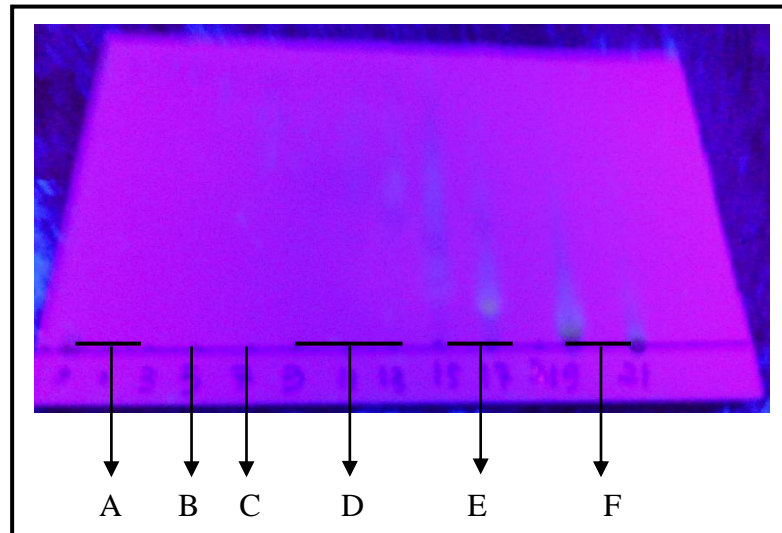
Hasil dari proses pemisahan dengan Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk uji pemurnian senyawa hasil isolasi terangkum pada Tabel 5 berikut ini :

Tabel 5. Hasil Pemisahan dengan KVC, KKG dan KLT pemurnian

Teknik pemisahan yang digunakan	Pelarut yang digunakan dalam proses pemisahan	Keterangan	Volume fraksi hasil yang diproses lebih lanjut
KVC	n-heksan 100%, n-heksan : etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1), etil asetat 100%, Aseton dan metanol.	Diperoleh 6 fraksi, yaitu: fraksi A(1-3), B(4-5), C(6-8), D(9-13), E(14-17), F(18-21) Fraksi D dipilih untuk pemisahan lebih lanjut dengan KKG. $R_f = 0,58$	Fraksi D = 340 mL
KKG Fraksi D (9-13)	n-heksan : etil asetat (9:1)	Diperoleh sebanyak 97 botol dan dikelompokkan menjadi 7 fraksi, dan fraksi V (35-40) dipilih sebagai fraksi utama $R_f = 0,28$	Fraksi V = 25 mL
KLT pemurnian senyawa hasil isolasi	n-heksan : etil asetat (8:2), n-heksan : etil asetat (6:4), etil asetat : kloroform (8:2)	$R_{f1} = 0,675$ $R_{f2} = 0,25$ $R_{f3} = 0,475$	

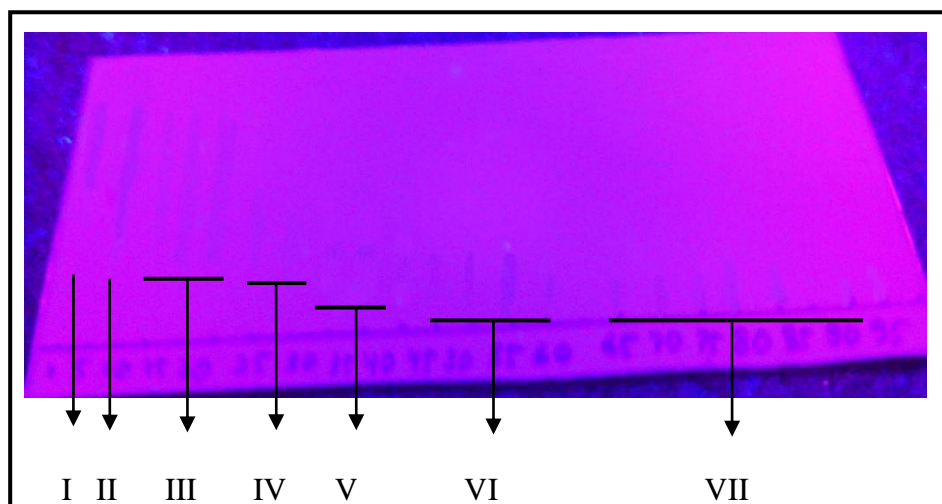
Hasil kromatogram dari proses pemisahan secara Kromatografi Vakum Cair (KVC) dengan eluen n-Heksan : Etil asetat 7 : 3 diperoleh 6 fraksi, yaitu

fraksi A(1-3), B(4-5), C(6-8), D(9-13), E(14-17) dan F(18-21) seperti terlihat pada Gambar 6 berikut ini:



Gambar 6. Kromatogram KLT hasil KVC

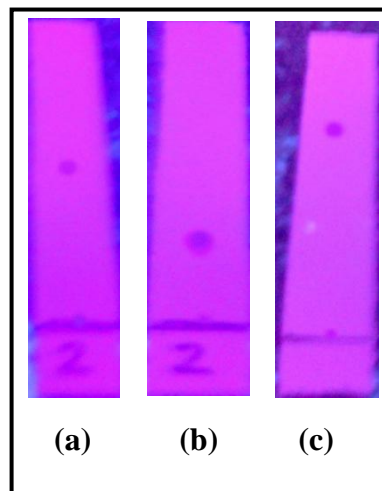
Hasil kromatogram dari proses pemisahan secara Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) dengan eluen n-heksan : Etil asetat 7 : 3 diperoleh sebanyak 97 botol dan dikelompokkan menjadi 7 fraksi, dan fraksi V (35-40) dipilih sebagai fraksi utama seperti terlihat pada Gambar 7 berikut ini:



Gambar 7. Kromatogram KLT hasil KKG

Pada fraksi V (35-40) diperoleh kristal murni yang menunjukkan satu spot noda pada Kromatogram KLT hasil Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

yang diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan 3 campuran eluen yang berbeda yaitu Kloroform : etil asetat (8:2); n-heksan : etil asetat (6:4) dan n-heksan : etil asetat (8:2) seperti terlihat pada Gambar 8 berikut:

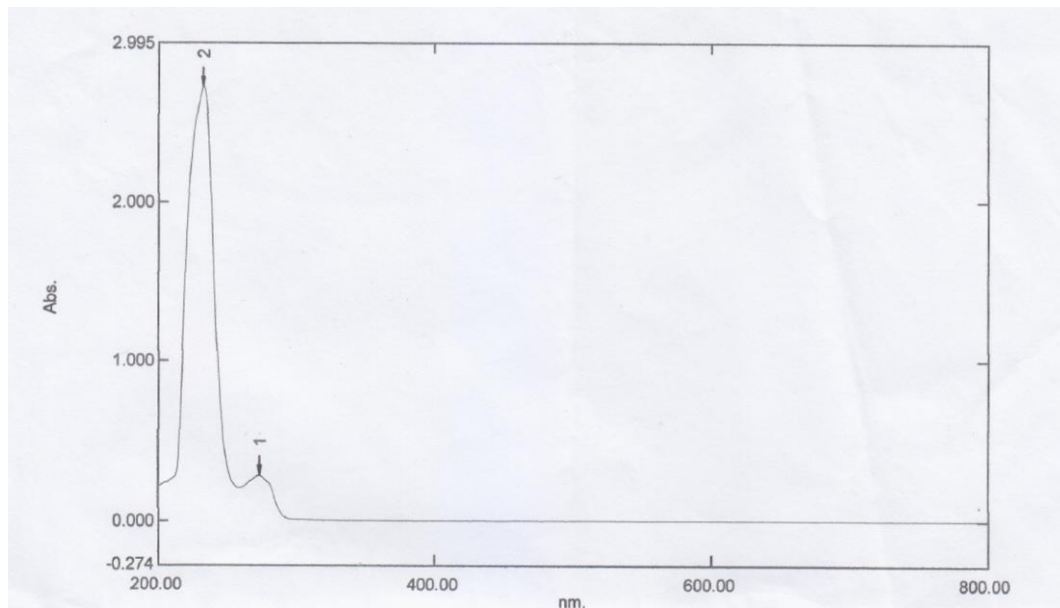


Gambar 8. Kromatogram KLT pemurnian (a). Kloroform:etil asetat (8:2)(b). N-heksan:etil asetat (6:4) (c). N-heksan:etil asetat (8:2)

3. Hasil Analisis dengan Spektroskopi

a. Hasil Analisis dengan Spektroskopi UV-Vis

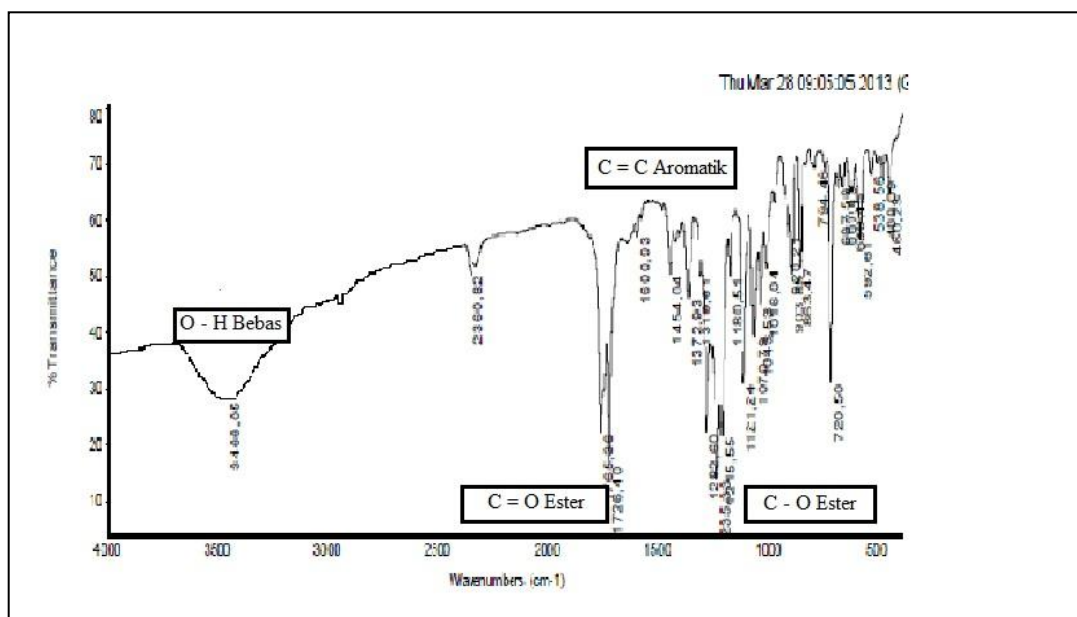
Spektrum UV-Vis hasil menunjukkan adanya serapan dari senyawa hasil isolasi pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 273,00 nm dan 232,50 nm seperti yang terdapat pada Gambar 9 hasil spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi berikut:



Gambar 9. Spektrum Spektroskopi UV–Vis senyawa hasil isolasi

b. Hasil Analisis dengan Spektroskopi IR

Gugus–gugus fungsional yang terdapat pada senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dapat diketahui dengan melihat spektrum IR yang tersaji pada Gambar 10 berikut ini :



Gambar 10. Spektrum IR senyawa hasil isolasi

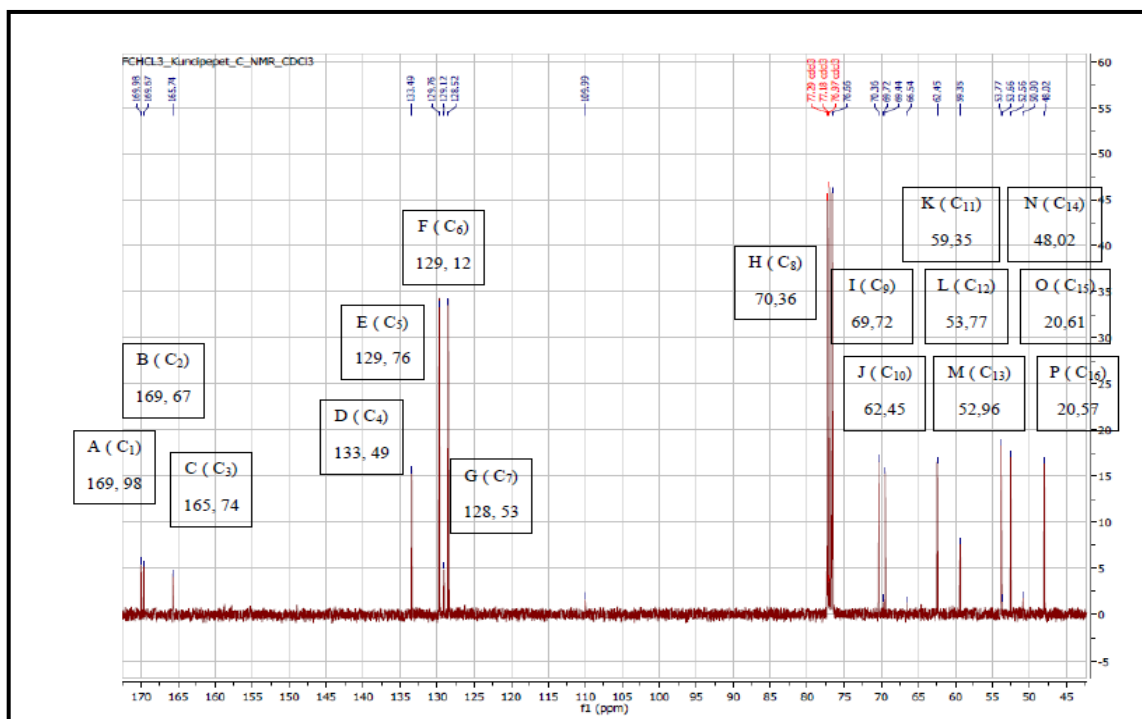
Berdasarkan spektrum IR tersebut, dapat diketahui daerah serapan gugus fungsional yang terdapat pada senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dari fraksi kloroform rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) seperti yang tersaji pada Tabel 6 berikut ini :

Tabel 6. Daerah serapan gugus fungsi senyawa hasil isolasi

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus fungsi
3466,05	O-H alkohol primer (bebas)
1726,40	C=O ester
1454,04 dan 1372,93	C=C aromatik
1235,33 dan 1282,60	C-O ester

c. Hasil Analisis dengan Spektroskopi ^{13}C -NMR

Analisis hasil spektrometer ^{13}C -NMR ditunjukkan pada Gambar 11. Sedangkan hasil analisis data pada spektrum ^{13}C -NMR menunjukkan adanya pergeseran kimia seperti yang terdapat pada Tabel 7 berikut ini :



Gambar 11. Hasil Spektrum ^{13}C -NMR senyawa hasil isolasi.

Tabel 7. Hasil Analisis Spektrum ^{13}C -NMR senyawa hasil isolasi.

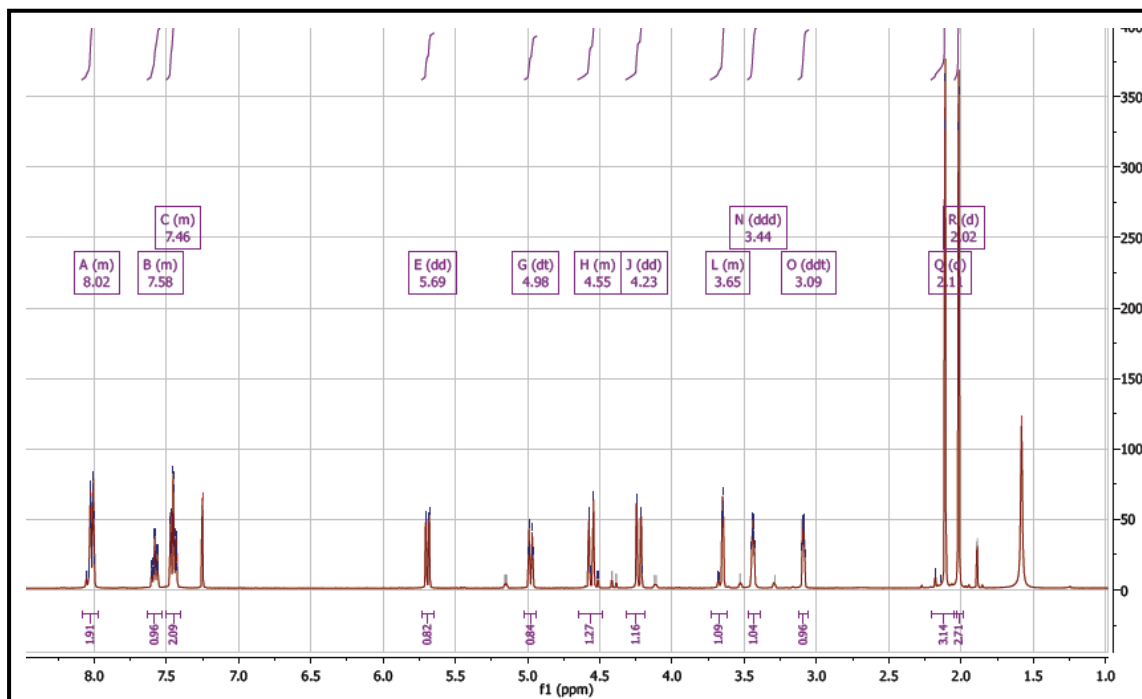
No.	Puncak	Pergeseran Kimia (δ)	Jenis Karbon
1.	A	169,98	C = O Asetil
2.	B	169,67	C = O Asetil
3.	C	165,74	C = O Karbonil Ester
4.	D	133,49	C – H Aromatik
5.	E	129,76	C – H Aromatik
6.	F	129,12	C – H Aromatik
7.	G	128,53	C – C Aromatik
8.	H	70,36	C – O Asetil
9.	I	69,72	C – O Asetil
10.	J	62,45	C – O Epoksida
11.	K	59,35	C – O Epoksida
12.	L	53,77	CH ₂ -
13.	M	52,96	C – O Epoksida
14.	N	48,02	C – O Epoksida
15.	O	20,61	CH ₃ -
16.	P	20,57	CH ₃ -

d. Hasil Analisis dengan Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$

Analisis hasil spektrometer $^1\text{H-NMR}$ ditunjukkan pada Gambar 12. Sedangkan hasil analisis data pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan adanya pergeseran kimia seperti yang terdapat pada Tabel 8 berikut ini :

Tabel 8. Hasil Analisis Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa hasil isolasi.

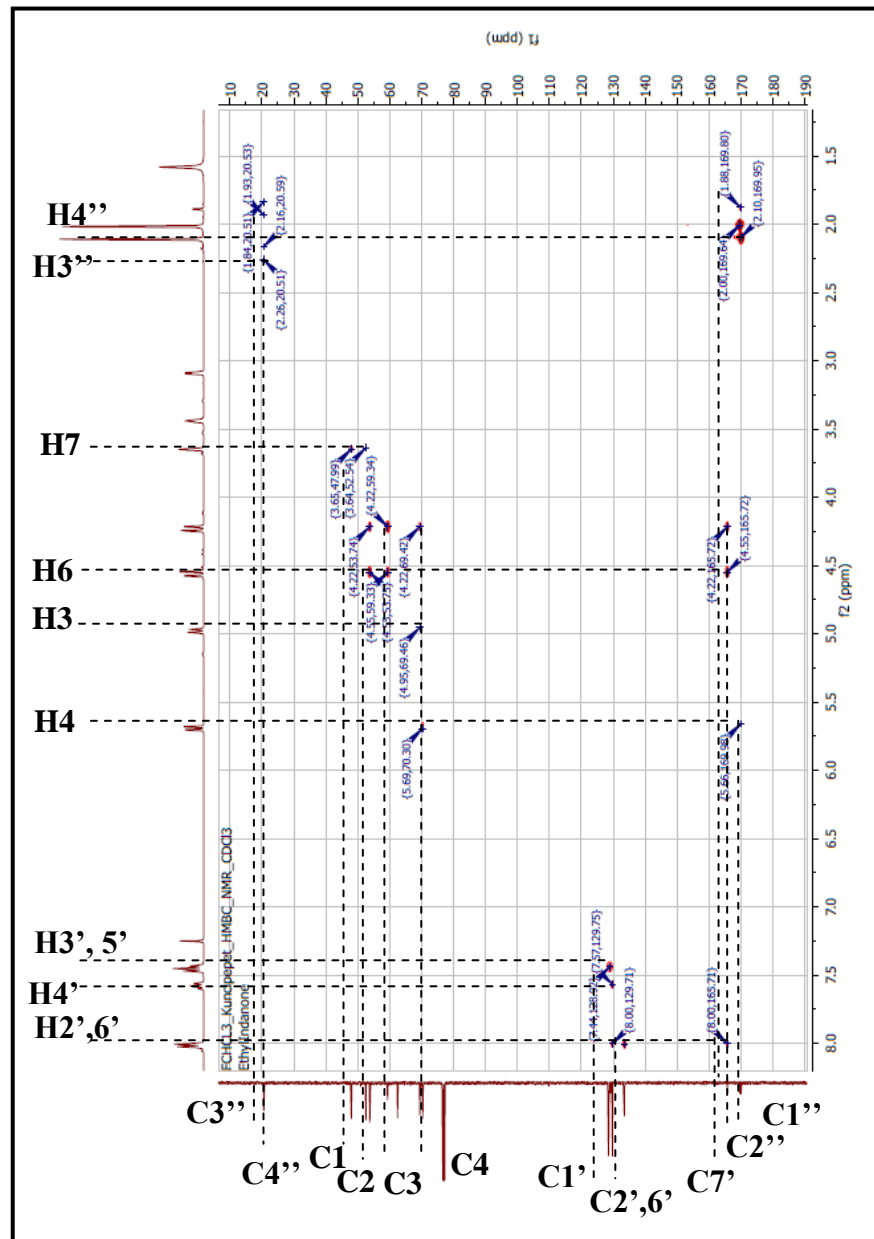
No.	Puncak	Pergeseran Kimia (δ)	Jumlah H	Multiplicitas
1.	A	8,02	2	Multiplet
2.	B	7,58	1	Multiplet
3.	C	7,45	2	Multiplet
4.	E	5,69	1	Double Doublet
5.	G	4,98	1	Double Triplet
6.	H	4,55	1	Double Doublet
7.	J	4,23	1	Double Doublet
8.	L	3,65	1	Multiplet
9.	N	3,44	1	Double Doublet Doublet
10.	O	3,09	1	Double Doublet Triplet
11.	R	2,11	3	Multiplet
12.	Q	2,02	3	Doublet



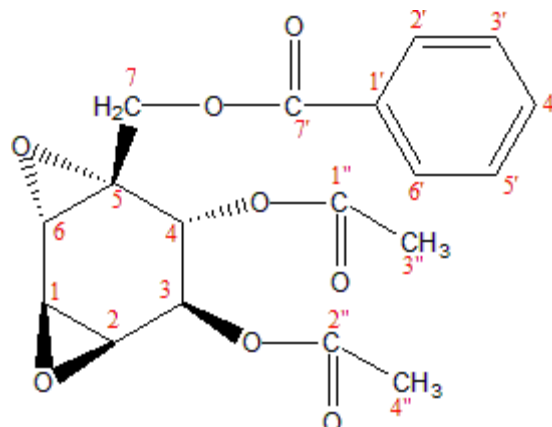
Gambar 12. Hasil Spektrum ^1H - NMR senyawa hasil isolasi.

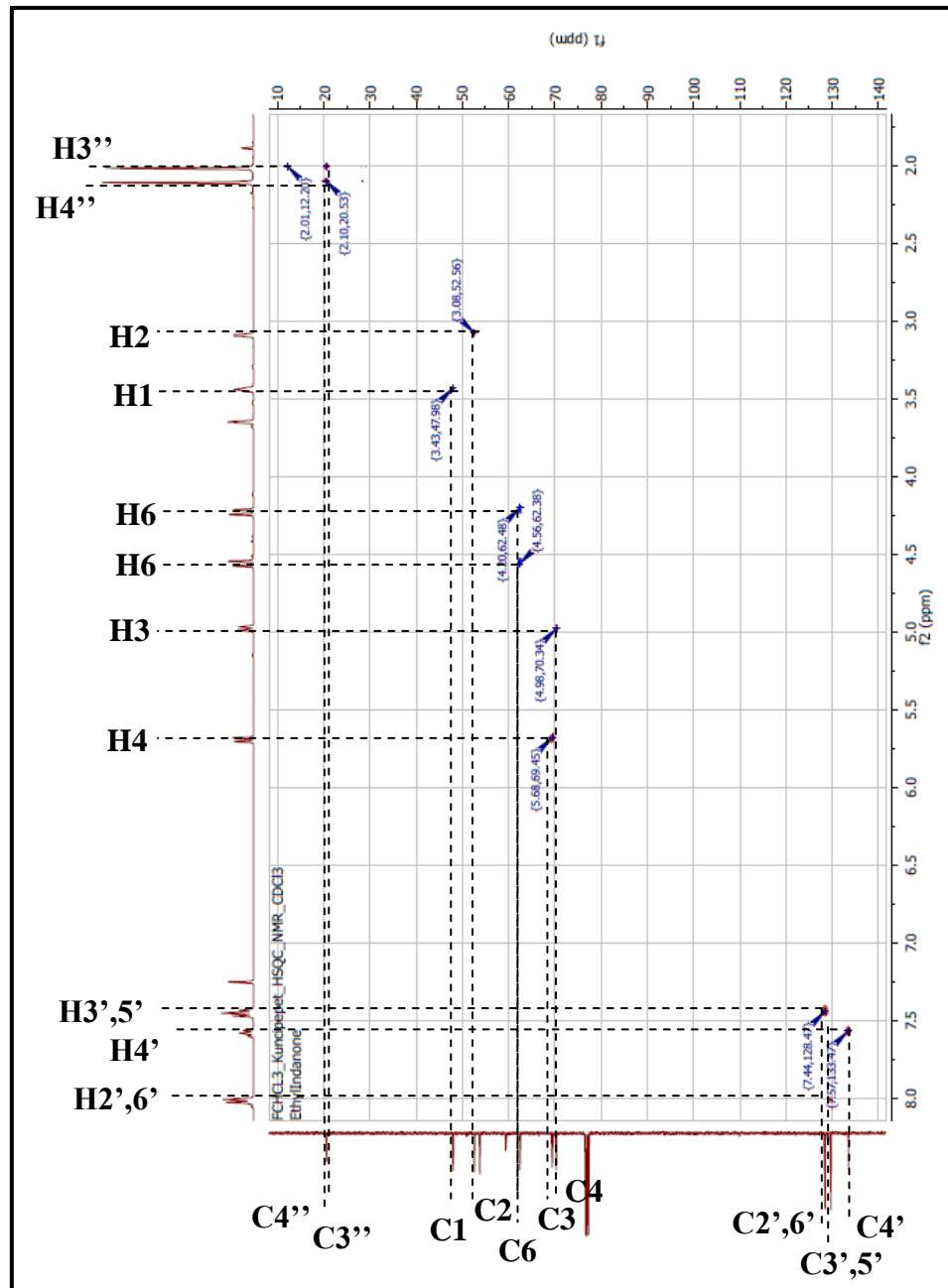
e. Hasil Analisis dengan HMBC dan HSQC

Analisis hasil spektrometer HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) dan HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) ditunjukkan pada Gambar 13 dan Gambar 14. Sedangkan hasil analisis data pada spektrum HMBC dan HSQC disajikan pada Tabel 9 berikut ini :

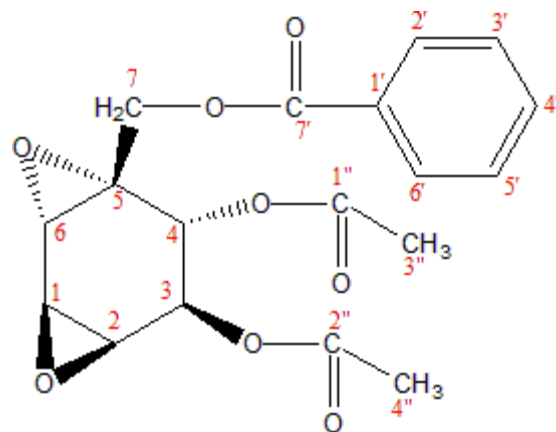


Gambar 13. Hasil Spektrum HMBC senyawa hasil isolasi.





Gambar 14. Hasil Spektrum HSQC senyawa hasil isolasi.



Tabel 9. Hasil Analisis Spektrum HMBC dan HSQC senyawa hasil isolasi.

No. Atom C	HSQC		HMBC
	δC (ppm)	δH (ppm)	$H^1 \rightarrow C^{13}$
1	48,02	3,44	H1/ C2
2	52,96	3,08	H2/ C2''
3	69,72	4,98	H3/ C4,C5
4	70,36	5,69	H4/ C2''
5	59,35	-	-
6	62,45	4,56 ; 4,23	H6/ C3,C7,C5
7	53,77	3,65	H7/ C1
1'	129,12	-	-
2',6'	129,76	8,02	H2',6'/ C1',C7',C4'
3',5'	128,52	7,45	H3',5'/ C1',C4'
4'	133,49	7,58	H4'/ C1'
7'	165,74	-	-
1''	169,98	-	-
2''	169,67	-	-
3''	20,61	2,11	H3''/ C4''
4''	20,57	2,02	H4''/ C2''

B. Pembahasan

Bagian rimpang pada berbagai macam tumbuhan banyak sekali digunakan oleh para peneliti sebagai sampel penelitian. Rimpang sesungguhnya adalah batang beserta daunnya yang terdapat di dalam tanah, bercabang-cabang dan tumbuh mendatar, dan dari ujungnya dapat tumbuh tunas yang muncul di

atas tanah dan dapat merupakan suatu tumbuhan baru. Rimpang di samping merupakan alat perkembangbiakan juga merupakan tempat penimbunan zat-zat makanan cadangan. Pada penelitian ini rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) yang digunakan adalah dalam bentuk simplisia dari Merapi Farma Yogyakarta dan rimpang kunci pepet segar dari pasar tradisional Kota Gede Yogyakarta yang diidentifikasi di laboratorium sistematik tumbuhan Fakultas Biologi UGM. Pada proses pembuatan serbuk dari rimpang kunci pepet pada penelitian ini diawali dengan memilih rimpang kunci pepet yang masih segar dan beraroma kuat. Setelah itu dikupas kulitnya dan dicuci bersih dengan air mengalir kemudian diiris tipis-tipis lalu dikeringkan menggunakan oven. Setelah proses pengeringan, sampel dihaluskan dengan cara digiling kemudian serbuk hasil gilingan diayak dan ditimbang untuk mengetahui massa serbuk. Massa serbuk yang diperoleh sebesar 6,6 kg. Tujuan dilakukannya pembuatan serbuk kunci pepet ini agar luas permukaan sampel yang akan dimaserasi nantinya akan lebih besar dan proses isolasi dengan maserasi yang dilakukan akan semakin maksimal.

a. Proses pemisahan dengan Maserasi dan Partisi

Penyusun komponen-komponen senyawa yang terdapat dalam rimpang kunci pepet merupakan senyawa yang cenderung polar dan non polar, sehingga pada proses isolasi dengan menggunakan metode maserasi ini digunakan pelarut metanol. Alkohol merupakan senyawa yang banyak digunakan sebagai pelarut pada proses ekstraksi. Salah satunya adalah metanol yang banyak digunakan sebagai pelarut pada proses maserasi, karena metanol mampu melarutkan hampir semua senyawa metabolit sekunder. Selain itu juga metanol memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 64°C , sehingga mudah untuk diuapkan pada proses evaporasi. Pada proses maserasi ini, sampel serbuk kunci pepet dilarutkan dengan metanol teknis didalam bejana kemudian digojok sesekali agar larutan homogen. Ketika proses perendaman sampel dalam pelarut metanol, pelarut akan menembus dinding sel dan akan masuk kedalam sel yang penuh dengan zat aktif. Ekstrak yang diperoleh pada proses maserasi sebanyak 14 L dengan warna

kuning kecoklatan. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring untuk menghilangkan pengotor yang ada didalamnya. Setelah itu ekstrak metanol dipekatkan dengan menggunakan evaporator.

Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dipartisi dengan menggunakan corong pisah. Partisi pertama dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksan teknis terdestilasi, tujuan dilakukan partisi pertama ini adalah untuk memisahkan ekstrak metanol yang larut dalam n-heksan dan ekstrak metanol yang tidak larut dalam n-heksan. Ekstrak metanol yang tidak larut dalam n-heksan kemudian dipartisi kembali menggunakan pelarut kloroform. Tujuan dilakukannya partisi ini adalah untuk mendapatkan senyawa yang lebih spesifik. Hasil ekstrak yang telah dipartisi kemudian dievaporasi sehingga diperoleh fraksi pekat kloroform. Ekstrak kloroform yang diperoleh sebanyak 158 mL dengan warna coklat kemerahan.

b. Proses pemisahan dengan KVC, KKG dan KLT pemurnian

Proses pemisahan yang pertama kali dilakukan adalah dengan menggunakan teknik Kromatografi Vakum Cair (KVC). Kolom yang digunakan pada proses KVC ini memiliki diameter 10 cm. Eluen yang digunakan untuk pemisahan secara KVC ini secara berturut-turut adalah pelarut n-heksan 100%, campuran eluen n-heksan : etil asetat dengan perbandingan (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), pelarut etil asetat 100% dan aseton. Berdasarkan hasil dari Kromatografi Vakum Cair ini diperoleh 8 botol fraksi, yang kemudian diidentifikasi dengan menggunakan KLT dari masing – masing botol fraksi dengan menggunakan campuran eluen n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 7 : 3. Hasil KLT dari 8 botol fraksi tersebut selanjutnya dikelompokkan berdasarkan kesamaan harga R_f yang diberikan sehingga dapat dikelompokkan menjadi 6 fraksi yaitu fraksi A(1-3), B(4-5), C (6-8), D (9-13), E (14-17) dan F(18-21). Dari keenam fraksi tersebut kemudian diambil fraksi D (9-13) sebanyak 340 mL kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator sehingga diperoleh fraksi pekat kloroform hasil KVC sebanyak 72 mL. Kromatogram KLT hasil KVC yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 6.

Proses pemisahan selanjutnya adalah dengan menggunakan teknik Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Pada proses ini kolom yang digunakan berdiameter 3 cm. Eluen yang digunakan pada KKG ini adalah campuran n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 9 : 1. Pada proses ini diperoleh 97 botol fraksi yang kemudian diidentifikasi dengan KLT dari masing-masing botol fraksi dengan menggunakan campuran eluen n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 7 : 3. Hasil KLT dari 97 botol tersebut dikelompokkan berdasarkan harga Rf yang diberikan, sehingga dapat dikelompokkan menjadi 7 kelompok fraksi yaitu I (1-4), II (5-10), III (11-20), IV (21-35), V (35-40), VI (41-55) dan VII (56-97). Pada fraksi V (35-40) menghasilkan noda tunggal dan pada botol fraksi V (35-40) diperoleh kristal berwarna putih mengendap dibagian bawah botol sehingga botol fraksi ini diidentifikasi lebih lanjut pada proses berikutnya. Kromatogram KLT hasil KKG dapat dilihat pada Gambar 7.

Senyawa yang telah diperoleh dari proses KKG yaitu fraksi V (35-40), pada fraksi ini diperoleh noda tunggal pada kromatogram KLT dan diuji kemurniannya dengan menggunakan 3 macam eluen yang berbeda yaitu eluen kloroform : etil asetat dengan perbandingan 8 : 2 diperoleh harga Rf 0,475 eluen n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8 : 2 diperoleh harga Rf 0,675 dan eluen n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 6 : 4 diperoleh harga Rf 0,25. Perhitungan harga Rf dapat dilihat pada lampiran 2. Pada tahap uji kemurnian kromatogram KLT hasil uji kemurnian menunjukkan noda tunggal pada masing-masing eluen yang digunakan. senyawa murni tersebut kemudian diidentifikasi lebih lanjut menggunakan Spektroskopi UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC dan HSQC untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder tersebut. Kromatogram KLT hasil uji kemurnian untuk fraksi V (35-40) dapat dilihat pada Gambar 8.

c. Analisis dengan spektrometer UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC dan HSQC.

Identifikasi awal dilakukan dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis. Hasil pengukuran senyawa hasil isolasi dengan spektrometer UV-Vis dalam pelarut metanol menunjukkan adanya serapan panjang gelombang maksimum pada 273,00 nm berupa serapan tajam dan pada panjang gelombang maksimum 232,50 nm berupa serapan lemah seperti terlihat pada Gambar 9. Pelarut yang digunakan pada spektrofotometer ini adalah metanol karena dapat melarutkan sampel dengan baik dan tidak menyerap radiasi ultraviolet. Identifikasi menggunakan spektrometer UV-Vis ini bertujuan untuk mengetahui adanya gugus kromofor pada senyawa yang akan diidentifikasi. Gugus kromofor adalah gugus fungsi yang menyerap radiasi didaerah ultraviolet dekat daerah tampak. Serapan panjang gelombang maksimum pada 273,00 nm menunjukkan transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ dan 232,50 nm menunjukkan transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ gugus kromofor ini adalah sistem yang mempunyai elektron baik pada orbital molekul tak mengikat (bebas) maupun pada π . Senyawa yang mempunyai orbital molekul n maupun π ialah senyawa yang mengandung atom yang mempunyai pasangan elektron sunyi dan orbital π atau atom yang mempunyai pasangan elektron sunyi terkonjugasi dengan atom lain yang mempunyai orbital π . Gugus kromofor tersebut adalah C=O dan C=C .

Identifikasi selanjutnya yaitu dengan menggunakan spektrometer IR untuk mengetahui gugus fungsional yang terkandung dalam senyawa hasil isolasi. Hasil spektrum IR ditunjukkan pada Gambar 10, sedangkan data hasil analisis spektrum IR disajikan pada Tabel 6. Hasil analisis dalam bentuk spektra infra merah memperlihatkan beberapa serapan radiasi yang khas dan karakteristik. Pita serapan yang tajam dan kuat pada daerah bilangan 3466,05 cm^{-1} diduga menunjukkan adanya gugus O-H (bebas), pita serapan yang tajam dengan intensitas kuat pada daerah bilangan 1726,40 cm^{-1} diduga menunjukkan adanya gugus C=O ester, pita serapan lemah pada daerah bilangan 1454,04 dan 1372,93 cm^{-1} diduga menunjukkan adanya gugus ikatan C=C aromatik, pita

serapan yang tajam dan kuat pada daerah bilangan 1235,33 dan 1282,60 cm^{-1} diduga menunjukkan adanya gugus C-O ester.

Identifikasi berikutnya dengan menggunakan spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dengan tujuan untuk mengetahui jenis proton yang terdapat pada senyawa hasil isolasi. Pada pengukuran senyawa hasil isolasi ini digunakan pelarut CDCl_3 . Hasil analisis spektrometer $^1\text{H-NMR}$ senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 11, sedangkan data hasil analisis spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Tabel 7. Hasil analisis dengan menggunakan spektrometer $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan adanya 18 jumlah proton pada gugus C-H alifatik. Selanjutnya identifikasi menggunakan spektrometer $^{13}\text{C-NMR}$ yang bertujuan untuk mengidentifikasi adanya atom karbon dalam senyawa hasil isolasi. Pada pengukuran senyawa hasil isolasi ini digunakan pelarut CDCl_3 . Hasil analisis spektrometer $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 12, sedangkan data hasil analisis spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Tabel 8. Dan hasil analisis menggunakan spektrometer $\text{C}^{13}\text{-NMR}$ menunjukkan adanya 16 jumlah karbon yang terdiri dari 3 ikatan C=O karbonil, 1 ikatan C-C, 6 ikatan C-O dan 6 ikatan C-H.

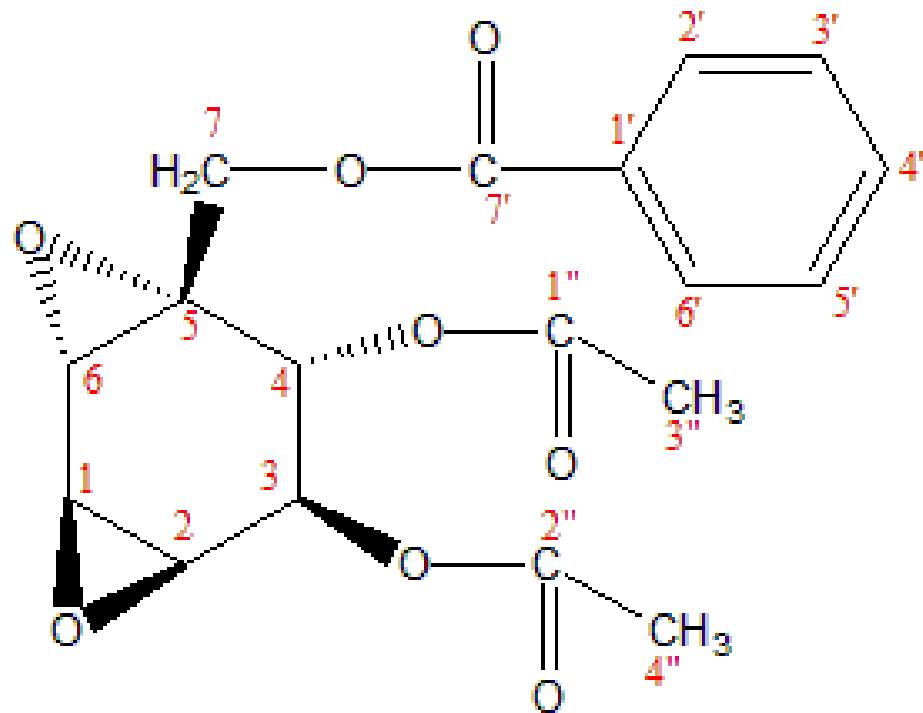
Identifikasi selanjutnya yaitu dengan spektrometer HSQC dan HMBC dengan tujuan untuk mengetahui ikatan antara proton dengan atom karbon yang terdapat pada senyawa hasil isolasi, dan interaksi yang terjadi antara proton dengan atom karbon yang ada didekatnya. Hasil analisis spektrometer HSQC senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 13 dan hasil analisis spektrometer HMBC senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 14. Sedangkan hasil analisis data spektrum HMBC dan HSQC disajikan pada Tabel 9. Dari hasil identifikasi yang dilakukan dengan menggunakan spektrometer UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC dan HSQC ada kemiripan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Puspa D.N Lotulung, Minarti, L.B.S. Kardono dan K. Kawanishi (2008) tentang *Antioxidant compound from the rhizomes of Kaempferia Rotunda L* dengan perbandingan hasil Spektroskopi NMR seperti disajikan pada Tabel 10 berikut :

Tabel 10. Perbandingan hasil HSQC dengan penelitian sebelumnya

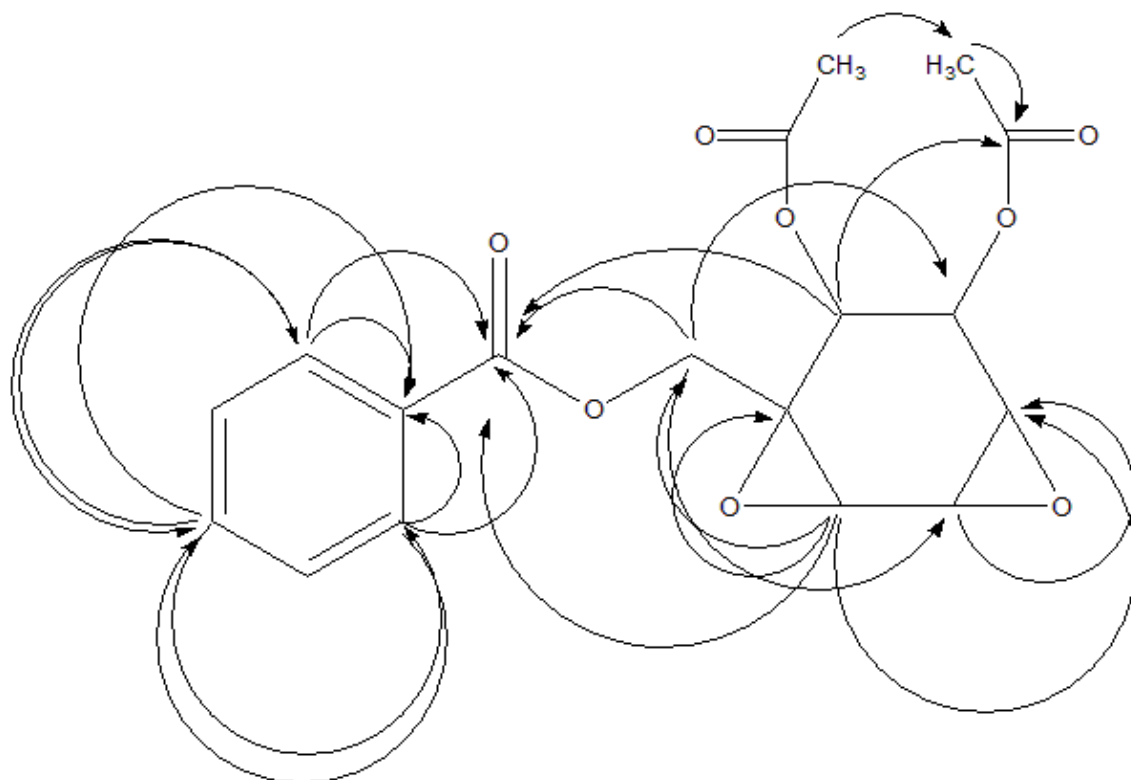
No. Atom C	HSQC Hasil		HSQC Perbandingan*	
	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)
1	48,02	3,44	48,25	3,44
2	52,96	3,09	52,80	3,09
3	69,72	4,98	69,72	4,99
4	70,36	5,69	70,61	5,69
5	59,35	-	59,61	-
6	62,45	4,55	62,69	4,57
7	53,77	3,65	54,01	3,65
1'	129,12	-	129,40	-
2',6'	129,76	8,02	130,01	8,02
3',5'	128,52	7,46	128,76	7,45
4'	133,49	7,58	133,72	7,58
7'	165,74	-	165,98	-
1''	169,98	-	170,21	-
2''	169,67	-	169,89	-
3''	20,61	2,11	20,83	2,11
4''	20,57	2,02	20,79	2,02

* Sumber : Hasil penelitian Puspa D.N Lotulung, Minarti, L.B.S. Kardono dan K. Kawanishi (2008) tentang *Antioxidant compound from the rhizomes of Kaempferia Rotunda L.*

Berdasarkan hasil elusidasi yang dilakukan terhadap hasil spectrum UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC dan HSQC diperkirakan bahwa senyawa metabolit sekunder hasil dari isolasi rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) yang diperoleh merupakan senyawa golongan epoksida yaitu senyawa krotepoksida dengan struktur senyawa pada Gambar 15 dan interaksi antara proton dengan atom karbon ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) berdasarkan data korelasi HMBC yang diperoleh pada Gambar 16 berikut ini :



Gambar 15. Struktur senyawa krotepoksida.



Gambar 16. Data korelasi HMBC (H → C) yang penting pada senyawa krotepoksida.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Isolasi senyawa metabolit sekunder pada fraksi kloroform rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) menggunakan metode maserasi, partisi dan pemisahan menggunakan metode Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) serta uji kemurnian menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) diperoleh kristal murni dari hasil Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) pada fraksi V (35-40) dengan nilai R_f dari hasil uji kemurnian menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sebesar 0,475; 0,675 dan 0,25.
2. Karakteristik senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) dengan menggunakan spektrometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) pada 273 nm dan 232,5 nm. Berdasarkan hasil analisis dengan spektrometer IR diperoleh data bahwa senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L) mengandung gugus C=O karbonil ester, ikatan rangkap C=C aromatik dan C-O ester. Hasil analisis dengan menggunakan spektrometer H¹-NMR menunjukkan adanya 18 jumlah proton pada C-H alifatik dan aromatik. Pada hasil analisis menggunakan spektrometer C¹³-NMR menunjukkan adanya 16 jumlah karbon yang terdiri dari 3 ikatan C=O karbonil, 1 ikatan C-C, 6 ikatan C-O dan 6 ikatan C-H. Dari data spektroskopi dapat diketahui bahwa senyawa yang terdapat pada fraksi kloroform rimpang kunci pepet termasuk dalam golongan epoksida yaitu senyawa krotepoksida.

B. Saran

1. Perlu dilakukan pengembangan penelitian lebih lanjut hingga uji aktivitas senyawa metabolit sekunder hasil isolasi.
2. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan bagian lain dari tanaman kunci pepet untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Rohman & Ibnu Gholib G. (2007). *Metode Kromatografi Untuk Analisis Makanan*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Abdul Rohman & Ibnu Gholib G. (2009). *Kimia Farmasi Analisis*. Jakarta : Pustaka Pelajar.
- Aguslina, K., Elisawati, W., & Sayekti, Palupi. (2002). Uji Efek Antidiare Ekstrak Etanol rimpang Kunci Pepet (*Kaempferia rotunda* L) terhadap Ileum Marmut terpisah. *Laporan Penelitian*. Farmasi Universitas Surabaya.
- Agusta, A. (2000). *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. Bandung : Penerbit ITB.
- Alimin. (2007). *Kimia Analitik*. Makasar : Alauddin Press.
- Azwar Agoes. (2010). *Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta : Salemba Medika.
- Budhi, M., Tengah, I.G.P., & Harjosuwito, B.A. (2007). Pemanfaatan Ekstrak Kunci Pepet (*kaempferia angustifolia*) sebagai Gel Reflektan terhadap Nyamuk *Aedes aegypti*. *Skripsi*. Universitas Udayana.
- Clark, Jim. (2007). Kromatografi Lapis Tipis. <http://www.chem-is-try.org/authors/jim-clark/kromatografi-lapis-tipis.html>. diakses pada 28 April 2013 pukul 19:32.
- Darfizzi, Derawi. (2013). Penghasilan Polioli Minyak Sawit Olein secara Hidrolisis Selanjat dan Berkelompok. *Jurnal Sains Malaysiana* 48(2) : 1121-1129
- Feng, Yau Sui. (2009). Chemical Constituents and Bioactivity of Malaysian and Indonesian *Kaempferia*. *Thesis*. Universiti Teknologi Malaysia.
- Fessenden, R.J., & Joan S.F. (1986). *Kimia Organik*. 3rd. ed. Jakarta : Erlangga.
- Fessenden, R.J., & Joan S.F. (2010). *Dasar-dasar Kimia Organik*. Jakarta : Bina Aksara
- Harborne, J.B. (1996). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Hard, Harnold. (1983). *Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat Edisi 6*. (Alih bahasa : Suminar Achmadi). Jakarta : Erlangga.

- Hardjono, S. (1985). *Dasar – Dasar Spektroskopi*. Yogyakarta : Penerbit Liberti.
- Hardjono, S. (2001). *Obat Asli Indonesia*. Jakarta : Dian Rakyat.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., & Marston, A. (1986). *Cara Kromatografi Preparatif Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam*. (Alih bahasa : Kosasih Padmawinata). Bandung : Penerbit ITB.
- Hostettmann, K., Wolfender, J., & Rodriguez, S. (1997). *Rapid Detection and Subsequent Isolation of Bioactive Constituents of Crude Plant Extracts*. San Diego : Academic Press.
- Ilmiyah, Jayanti. (2006). Efektifitas Berbagai Konsentrasi Infus Rimpang Kunci Pepet (*Kaempferia rotunda* L) Sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* secara In Vitro. *Karya Ilmiah*. Department of Biology Jakarta.
- Kardinan A. & Taryono. (2003). *Tanaman Obat Penggempur Kanker*. Bogor: Agromedia Pustaka.
- Keeler, J. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy*. 2nd. ed. UK : University of Cambridge.
- Khopkar, S. M. (2008). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. (Alih bahasa : A. Saptorahardjo). Jakarta : UI Press.
- Khopkar, S. M. (2010). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. (Alih bahasa : A. Saptorahardjo). Jakarta : UI Press.
- Monica, Widyawati. (2002). Penentuan Kadar Kurkuminoid dari Ekstrak Kunci Pepet (*Kaempferia Angustifolia*) secara Densitometri. *Jurnal Obat Bahan Alam*. Universitas Katolik Widya Mandala.1(2) : 40 - 44
- Muhammad, Taofik. (2010). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Air Daun Paitan (*Thitonia diversifolia*) Sebagai Bahan Insektisida Botani untuk Pengendalian Hama Tungau *Eriophyidae*. *Skripsi*. Universitas Islam Negri Malang.
- Muhlisah, F. (1999). *Temu-temuan dan Empon-empon*. Yogyakarta: Kanisius.
- Puspa, D.N Lotulung., Minarti, L.B.S., Kardono dan K. Kawanishi. (2008). Antioxidant Compound from the Rhizomes of *Kaempferia rotunda* L. *Pakistan Journal of Biological Science*. 11(20) : 2447-2450.

- Robinson, J. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. (Alih bahasa : Kosasih Padmawinata). Bandung : Penerbit ITB.
- Rusdi.(1990). *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*.Padang : Pusat Penelitian Universitas Andalas.
- Setiaji, Sastrapradja. (1977). *Kunci Pepet Kaempferia rotunda L*. Jakarta : PDII-LIPI.
- Sitorus, Marham. (2009). *Spektroskopi: Elusidasi Struktur Molekul Organik*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Sjamsul, Arifin A. (1986). *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta : Depdikbud.
- Soebagio.(2002). *Kimia Analitik II*. Malang : JICA.
- Sovia Lenny. (2006). Senyawa Flavanoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida.*Karya Ilmiah* : Universitas Sumatra Utara.
- Sri Budi Sulianti & Sofnie,M.C. (2005). Perbandingan Komposisi Kimia Minyak Atsiri Dua Jenis Kunci Pepet (*Kaempferia angustifolia roscue*. dan*K. rotundaLinn.*). JurusanBiologi FMIPA UNS Surakarta: *Biofarmasi* 3(2) : 39-42.
- Sudjadi.(1985). *Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Yogyakarta : UGM Press.
- Sudjadi.(1986). *Metode Pemisahan*.Yogyakarta : UGM press.
- Sumaryono.(1999). Produksi Metabolit Sekunder Tanaman Secara Bioteknologi. *Prosiding Semnas Kimia Bahan Alam*. Penerbit UI. Jakarta.

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian



Proses destilasi pelarut



Ekstrak pekat kloroform



Ekstrak kloroform hasil KVC Impregnasi pada proses pemisahan KVC





Ekstrak kloroform hasil KKG



Botol fraksi hasil KKG



Kristal hasil pemurnian KKG



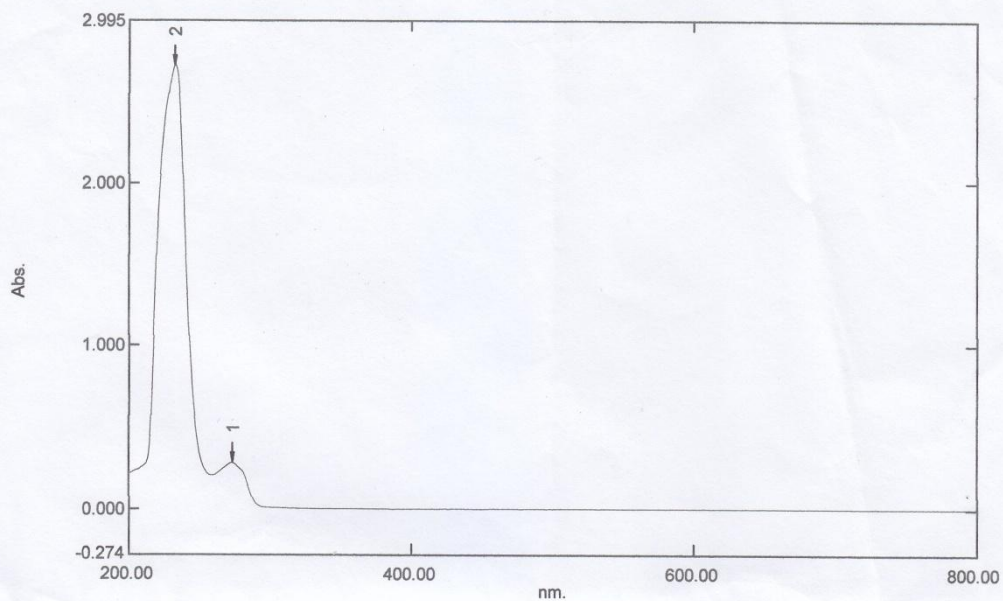
Proses pemisahan KKG

Lampiran 2. Spektrum UV-Vis

Spectrum Peak Pick Report

03/14/2013 12:01:56 PM

Data Set: ekstrak kunci pepet fraksi kloroform - RawData



Measurement Properties
 Wavelength Range (nm.): 200.00 to 800.00
 Scan Speed: Fast
 Sampling Interval: 0.5
 Auto Sampling Interval: Enabled
 Scan Mode: Single

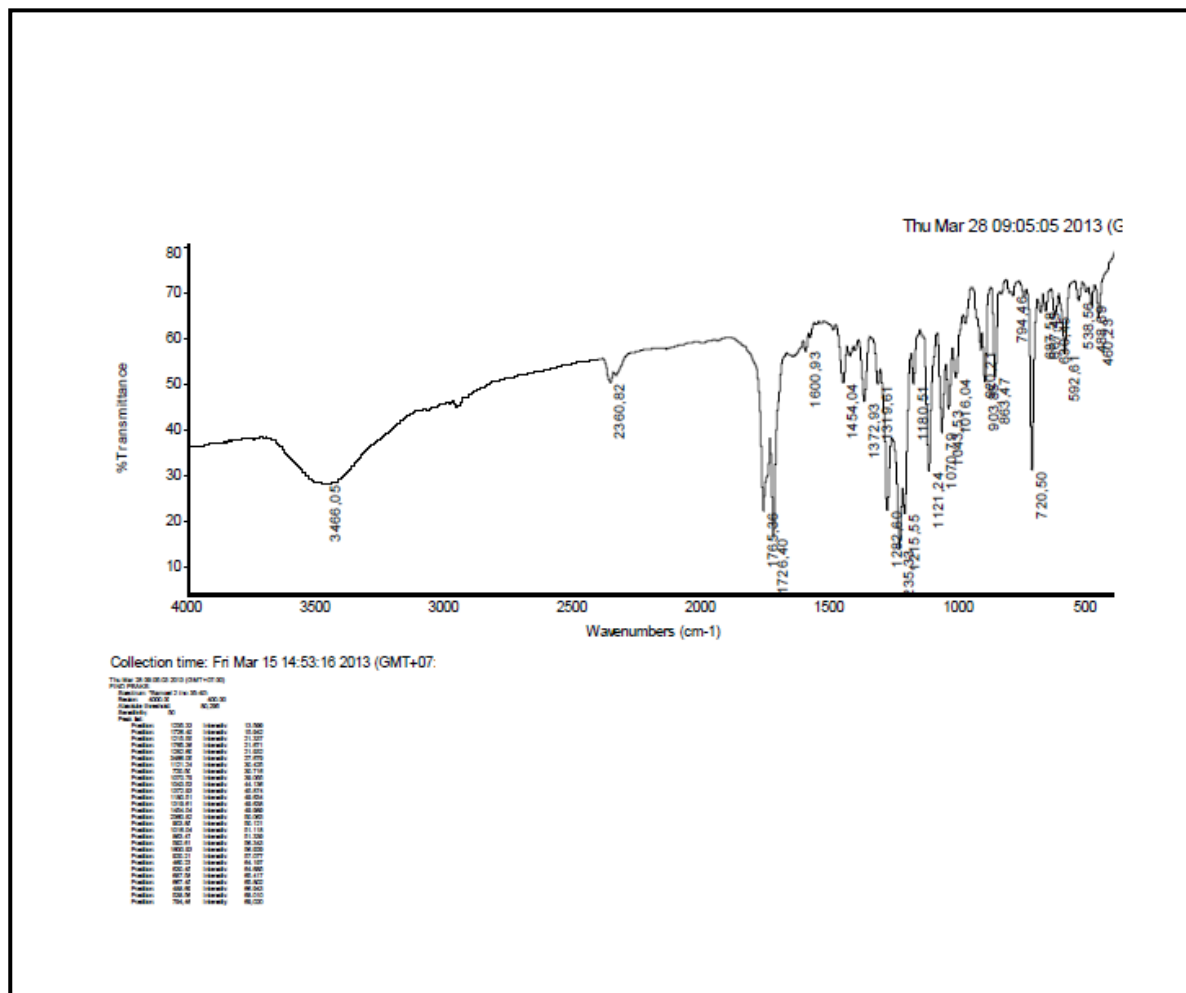
No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	273.00	0.282	
2	●	232.50	2.723	

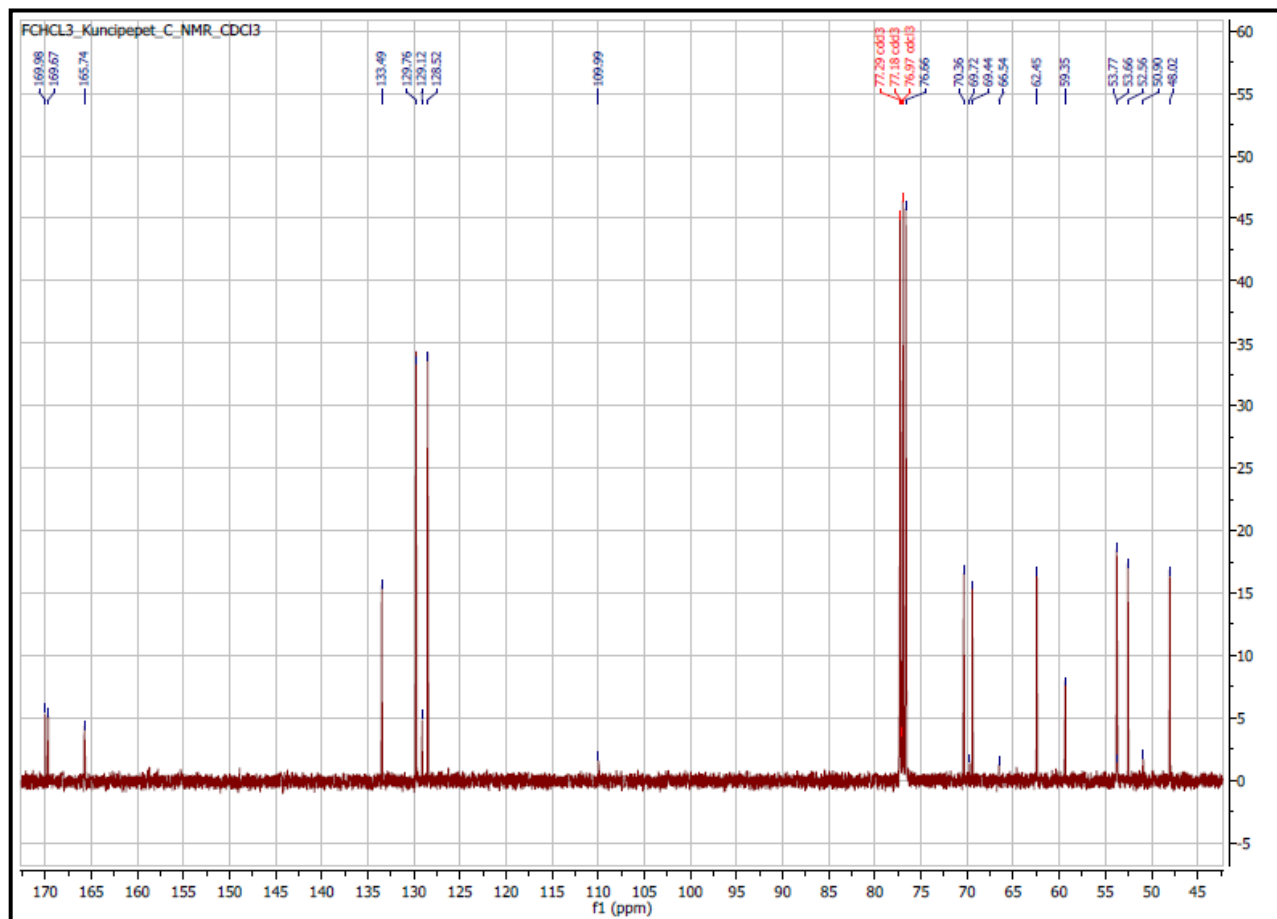
Instrument Properties
 Instrument Type: UV-2400PC Series
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 5.0 nm
 Light Source Change Wavelength: 360.0 nm
 S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
 Attachment: None

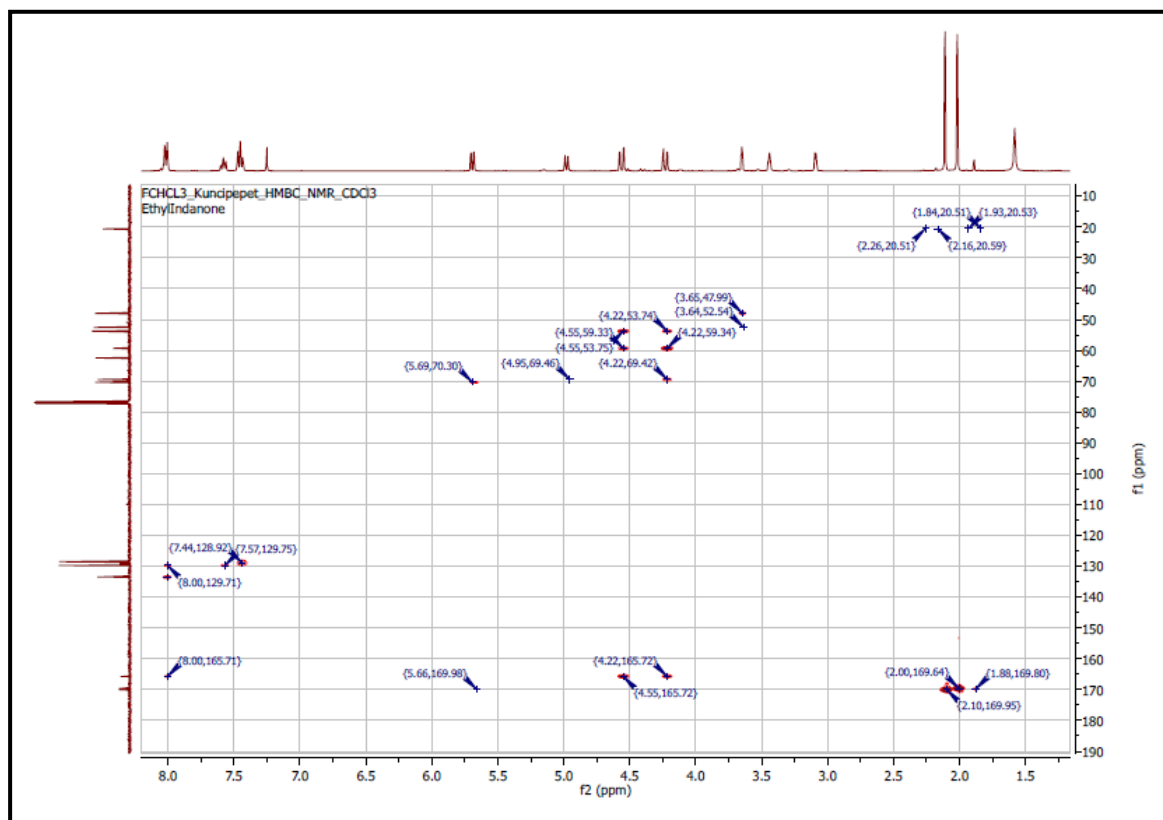
Sample Preparation Properties
 Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:
 Additional Information:

Lampiran 3. Spektrum IR

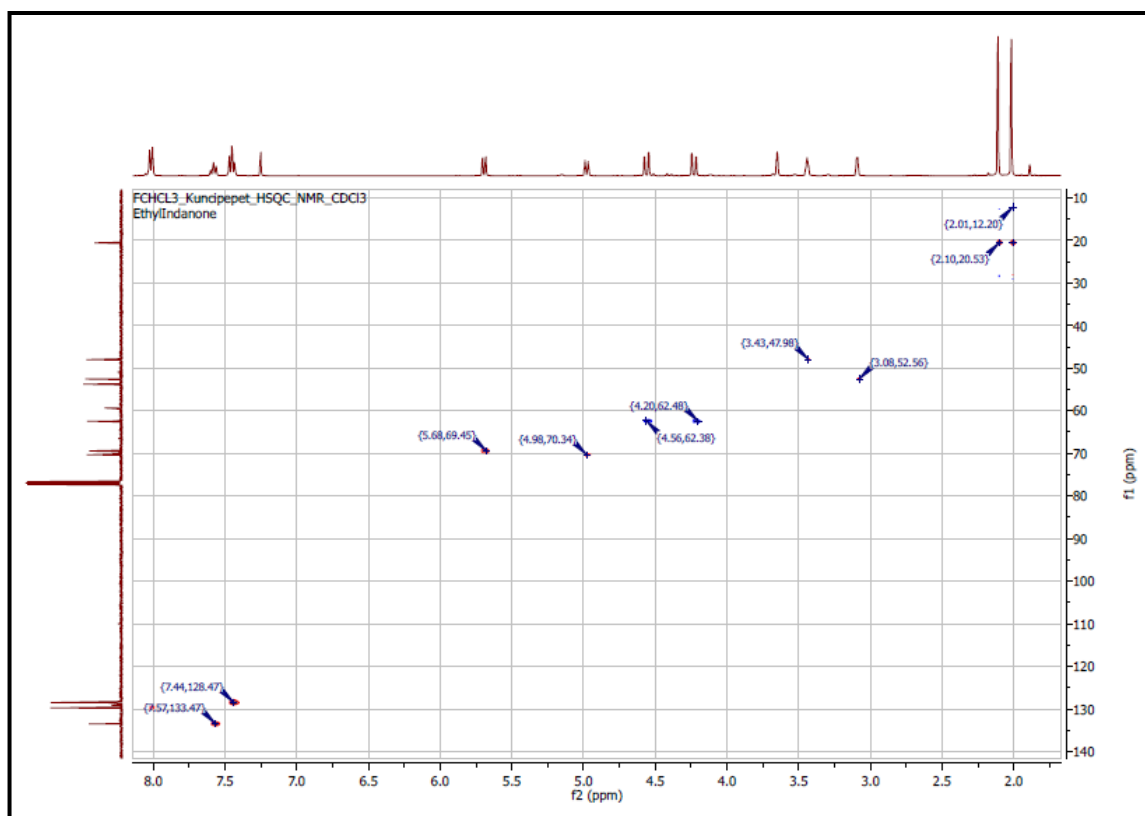


Lampiran 5. Spektrum ^{13}C -NMR

Lampiran 6. Spektrum HMBC



Lampiran 7. Spektrum HSQC



Lampiran 8. Hasil determinasi tanaman Kunci Pepet (*Kaempferia rotunda* L)



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIK TUMBUHAN

Jalan Teknik Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpun 6492262/6492272 Fax: 0274580839

SURAT KETERANGAN

Nomor: 0345/S.Tb/V/2012

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistemik Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,

Nama : Indri Pratiwi
Asal instansi : Fakultas MIPA Universitas Negeri Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut,

SAMPEL	FAMILIA	GENUS	SPECIES	NAMA DAERAH
1.	Zingiberaceae	Kaempferia	<i>Kaempferia rotunda</i> L.	Kunci Pepet

Identifikasi tersebut dibantu oleh Drs. Heri Sujadmiko, M.Si.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada

Dr. Retno Peni Sancayaningsih, M.Sc
NIP. 195509291982032002

Yogyakarta, 24 Mei 2012

Kepala Laboratorium
Sistemik Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM

Drs. Heri Sujadmiko, M.Si
NIP. 19640209 199103 1001

Lampiran 9. Perhitungan harga Rf hasil KLT pemurnian

1. KLT pemurnian dengan eluen n-heksan : etil asetat (8:2)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa (cm)}}{\text{Jarak tempuh eluen (cm)}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = \frac{2,7 \text{ cm}}{4 \text{ cm}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = 0,675$$

2. KLT pemurnian dengan eluen n-heksan : etil asetat (6:4)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa (cm)}}{\text{Jarak tempuh eluen (cm)}}$$

$$\text{Harga Rf}_2 = \frac{1 \text{ cm}}{4 \text{ cm}}$$

$$\text{Harga Rf}_2 = 0,25$$

3. KLT pemurnian dengan eluen kloroform : etil asetat (8:2)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa (cm)}}{\text{Jarak tempuh eluen (cm)}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = \frac{1,9 \text{ cm}}{4 \text{ cm}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = 0,475$$

Lampiran 10. Skema prosedur kerja