

BAB II Tinjauan Pustaka

II.1 Morfologi dan Taksonomi Kapulaga (*Amomum cardamomum*)

Kapulaga merupakan tanaman tahunan berupa perdu dengan tinggi 1,5 m, berbatang semu, buahnya berbentuk bulat, membentuk anakan berwarna hijau. Mempunyai daun tunggal yang tersebar, berbentuk lanset, ujung runcing dengan tepi rata. Pangkal daun berbentuk runcing dengan panjang 25-35 cm dan lebar 10- 12 cm, pertulangan menyirip dan berwarna hijau. Batang kapulaga disebut batang semu, karena terbungkus oleh pelepah daun yang berwarna hijau, bentuk batang bulat, tumbuh tegak, tingginya sekitar 1-3 m. Batang tumbuh dari rizoma yang berada di bawah permukaan tanah, satu rumpun bisa mencapai 20-30 batang semu, batang tua akan mati dan diganti oleh batang muda yang tumbuh dari rizoma lain. Kapulaga berbunga majemuk, berbentuk bonggol yang terletak di pangkal batang dengan panjang kelopak bunga 12,5 cm di kepala sari terbentuk elips dengan panjang 2 mm, tangkai putik tidak berbulu, dan berbentuk mangkok. Mahkota berbentuk tabung dengan panjang 12,5 mm, berwarna putih atau putih kekuningan. Mahkota berbuah kotak dengan biji kecil berwarna hitam (Maryani, 2003).

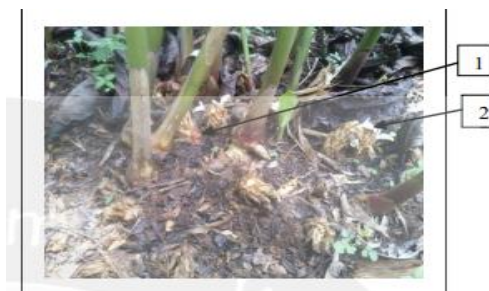
Buahnya berupa buah kotak, terdapat dalam tandan kecil-kecil dan pendek. Buah bulat memanjang, berlekuk, bersegi tiga, agak pipih, kadang-kadang berbulu, berwarna putih kekuningan atau kuning kelabu. Buah beruang 3, setiap ruang dipisahkan oleh selaput tipis setebal kertas. Tiap ruang berisi 5-7 biji kecil- 11 kecil, berwarna

coklat atau hitam, beraroma harum yang khas. Dalam ruang biji-biji ini tersusun memanjang 2 baris, melekat satu sama lain (Sinaga, 2008). Buah tersusun rapat pada tandan, terdapat 5-8 buah pada setiap tandannya. Bentuk buah bulat dan beruang tiga, setiap buah mengandung 14-16 biji dan kulit buah berbulu halus. Panjang buah mencapai 10-16 mm. Kapulaga di daerah Sumatra dikenal dengan nama roude cardemon (Aceh), kalpulaga (Melayu), pelage puwar (Minangkabau), di Jawa dikenal dengan nama palago (Sunda), kapulaga (Jawa), Kapulaga (Madura), dan kapolagha (Bali). Di Sulawesi dikenal dengan nama kapulaga (Makassar) dan gandimong (Bugis) (Maryani, 2003). Kedudukan taksonomi kapulaga menurut Backer, sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Liliopsida
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: Amomum
Jenis	: <i>Amomum cardamomum</i>

Tanaman kapulaga berasal dari pegunungan Malabar, pantai barat India. Tanaman ini laku di pasar dunia, sehingga banyak ditanam di Srilanka, Thailand dan Guatemala, sedangkan di Indonesia, kapulaga mulai dibudidayakan sejak tahun 1986. Tanaman kapulaga tergolong dalam herba dan membentuk rumpun, sosoknya seperti tumbuhan

jahe dan dapat mencapai ketinggian 2 - 3 meter dan tumbuh di hutan-hutan yang masih lebat (Anonim, 2011). Kapulaga (*Amomumcardamomum*) (Sinaga, 2008).



Gambar II.2. Buah Kapulaga yang masih berada pada tandan buah dan bunga. Keterangan : 1. Buah, 2. Bunga

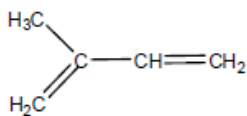
II.2 Kandungan Kimia Kapulaga

Kandungan kimia utama yang terdapat dalam tumbuhan *Amomum* (*Essensial Oil*) yaitu flavonoid, kumarin dan steroid. Terutama kandungan kimia dari EO terdiri dari monoterpen hidrokarbon dan monoterpena teroksigenasi seperti *pinene*, *phellandrene*, *1,8-cineole*, *terpineol*, *geraniol* dan *geranial* (Wang, 2017).

Senyawa sesquiterpenyang terjadi dalam jumlah yang lebih tinggi adalah *farnesyl acetate* (18,5%), *zerumbone* (16,4%) dan β -*caryophyllene* (10,5%). Kuantitas benzil yang signifikan benzoat (6,5%), δ -kadinena (4,5%), valensi (3,9%), α -humulena (3,2) dan bornil asetat (3,0%) juga diidentifikasi dalam minyak. Di sisi lain, hidrokarbon monoterpen (75,7%) mewakili golongan senyawa yang paling melimpah yang ada dalam minyak *Amomum*. Minyak juga

fitur proporsi yang cukup besar monoterpen oksigenasi (7,4%), diterpen (5,0%) dan non-terpen (5,6%). Monoterpen, β -Pinen (33,5%) adalah satu-satunya senyawa yang terjadi dalam jumlah tertinggi. Ada sejumlah besar (E) - β -ocimen (9,6%), γ -terpinen (9,1%) dan α -pinen (8,4) (Hong, 2015). Maka dapat dipastikan bahwa senyawa penyusun utama dari minyak esensial dari *Amomum* adalah Terpenoid.

Terpenoid adalah senyawa yang hanya mengandung karbon dan hidrogen, atau karbon, hidrogen dan oksigen yang bersifat aromatis, sebagian terpenoid mengandung atom karbon yang jumlahnya merupakan kelipatan lima. Penyelidikan kimia selanjutnya menunjukkan pula bahwa sebagian terpenoid mempunyai kerangka karbon yang di bangun oleh dua atom atau lebih unit C₅ yang disebut isopren, unit unit isopren biasanya saling berkaitan dengan teratur, dimana “kepala” dari unit satu berkaitan dengan “ekor” unit yang lain, kepala merupakan ujung terdekat kecabang metil dan ekor merupakan ujung yang lain.



Gambar II.3 : struktur Terpenoid

Susunan kepala-ke-ekor ini disebut kaidah isopren. Kaidah ini merupakan ciri khas dari sebagian terpenoid sehingga dapat dijadikan dasar penetapan terpenoid, sehingga dapat digunakan sebagai dasar penetapan struktur terpenoid (Achmad, 1986).

Berdasarkan jumlah atom karbon atau unit isopren yang membentuk senyawa terpen / terpenoid dapat di klasifikasikan sebagai berikut (Fessenden & Fessenden, 1992)

Tabel. II.1. Klasifikasi Senyawa Terpenoid

No	Kelompok	Jumlah Atom Karbon / C
1	Monoterpen	10
2	Seskuiteren	15
3	Diterpen	20
4	Triterpen	30
5	Tetraterpen	40
6	Politerpen	>40

Selanjutnya monoterpen (C_{10}) dan seskuiterpen (C_{15}) merupakan komponen utama dari minyak atsiri. Monoterpen mempunyai sifat-sifat berupa cairan tidak berwarna, tidak larut dalam air, disuling dengan uap air, berinteraksi dengan lemak/minyak berbau harum, indeks bias tinggi, kebanyakan optik aktif, kerapatan lebih kecil dari air, larut dalam pelarut organik : eter dan alkohol. Dan memiliki sifat kimia senyawa tidak jenuh (rantai terbuka ataupun siklik) dan isoprenoid kebanyakan bentuknya khiral dan terjadi dalam dua bentuk enantiomer (Robinson, 1995).

II.3 Aktivitas *Amomum*

II.3.1 Genus *Amomum*

Berbagai penelitian dari Kapulaga (*Amomum cardamomum*) menunjukkan sebagai anti-oksidan, antihipertensi, proteksi gastrointestinal, antispasmodic, antibakteri, agregasi antiplatelet dan sifat antikanker (Kuyumcu & Zehra, 2013). Menunjukkan sebagai anti-inflamasi, anti-proliferatif, anti-invasif dan anti-angiogenik (Bhattacharjee dan Chatterjee, 2013)

II.2.3 Spesies *Amomum*

- Etnobotani

Kapulaga (*Amomum cardamomum*) adalah salah satu bumbu yang paling umum digunakan dan dikenal sebagai “ratu rempah-rempah”. Kapulaga dari keluarga *Zingiberaceae* adalah salah satu rempah-rempah yang sangat kuno dan mahal di dunia. Tanaman ini terkenal karena buah nya yang kering. Pada tanaman ini bijinya digunakan sebagai bubuk dalam campuran rempah-rempah seperti kari, pada minuman seperti teh dan kopi, lalu digunakan untuk makanan yang dipanggang, produk daging, dan digunakan untuk bumbu kue. Minyak atsiri dari biji kapulaga digunakan sebagai penyedap kue-kue, gula-gula dan parfum. (Parthasarathy *et al.*, 2012)

- Etnofarmakologi

Kapulaga (*Amomum cardamomum*) digunakan untuk mengobati batuk, mulut berbau, gatal tenggorkan. Dapat juga digunakan dalam obat-obatan untuk kehilangan nafsu makan, untuk gangguan

pencernaan, untuk perut kembung, dan anti muntah (Parthasarathy *et al.*, 2012)

Amomum menghasilkan efek terapeutik, dan berbagai sifat farmakologi lainnya seperti anti-inflamsi, efek analgesik, menurunkan tekanan darah, diuretik, antimikroba, antiplatelet, antioksidan dan antikanker (Masoumi *et al.*, 2016)

II.4 Kanker

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan mekanisme tidak normal dan tidak terkontrol pada pengaturan kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi sel. Jika penyebaran kanker tidak terkontrol maka dapat menyebabkan kematian (Hondermarck, 2003).

Kanker merupakan sel yang tumbuh tidak terkendali dan berpotensi menyerang jaringan lokal serta menyebar ke bagian tubuh lainnya, atau dikenal dengan proses metastasis. Kanker menjadi penyebab utama kematian orang Amerika dengan usia di bawah 85 tahun (Herrmann dan Nehdi, 2015).

Mekanisme kerja *Amomum* ini diperoleh dari *essential oil* dengan konsentrasi tinggi sehingga memberikan aktivitas anti-tumor sebanding dengan mitomisin, berpotensi dengan toksisitas yang lebih rendah terhadap sel normal manusia. Total minyak esensial dari *Amomum* dapat meningkatkan tingkat permeasi percutan, sehingga mungkin saja dapat bekerja dalam kombinasi dengan obat anti tumor lainnya. Kandungan yang aktif sebagai antikanker adalah senyawa benzaldehid, senyawa amoksaokonal, dan golongan terpenoid (Oiyashee, 2011).

Karakteristik yang luar biasa dari mayoritas sel kanker adalah bahwa mereka gagal untuk menjalani apoptosis, yang pada gilirannya memberi keuntungan bertahan hidup dibandingkan sel normal. Dengan demikian, obat yang dapat mengembalikan fungsi apoptosis protein (termasuk protein keluarga BCL2) dapat digunakan sebagai agen antikanker (Radha dan Raghavan, 2017).

Antiapoptosis protein BCL2 berfungsi sebagai target yang sangat baik untuk terapi antikanker karena tingkat peningkatannya dalam kanker (Vartak *et al*, 2016).

Terapi kanker target adalah salah satu strategi yang digunakan untuk menghilangkan sel kanker secara tepat dengan dampak yang sedikit pada sel normal yang berdekatan. Bekerja dengan menargetkan protein spesifik yang diregulasikan dalam sel kanker. Modalitas antikanker konvensional melibatkan radioterapi dan kemoterapi, yang bertujuan untuk membunuh sel aktif proliferasi tanpa membedakan antara sel sehat dan kanker (Radha dan Raghavan, 2017).

II.4.1 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang sering terjadi pada wanita meskipun laki-laki juga memiliki risiko terkena kanker tersebut. Frekuensi kanker payudara relatif tinggi, terutama pada wanita usia 40 tahun ke atas (Rahmatari, 2014). Beberapa penelitian telah menunjukkan adanya faktor risiko tertentu yang dapat meningkatkan seseorang mengalami kanker payudara. Faktor risiko tersebut dikelompokkan menjadi 2, yakni faktor risiko yang dapat dikontrol, seperti berat badan, aktivitas fisik, dan konsumsi

alkohol serta faktor yang tidak dapat dikontrol, seperti usia, riwayat keluarga, dan riwayat kesehatan (Lakshmi *et al.*, 2012).

Berdasarkan karakter dan histologinya, kanker payudara dikelompokkan menjadi 2, yakni :

1. Kanker Payudara Invasif

Kanker payudara biasanya muncul di saluran atau lobulus kelenjar susu. Ketika sel-sel tumor menyusup di sekitar jaringan payudara, maka saat itulah diagnosis kanker payudara invasif dilakukan (Chisholm-Burns *et al.*, 2016).

2. Karsinoma Noninvasif

Kanker payudara yang tidak termasuk kasus karsinoma *in situ* (yaitu, tumor yang tidak hanya masuk pada saluran dan lobulus). Sebagian besar kanker payudara adalah adenokarsinoma dan diklasifikasikan berdasarkan penampilan mikroskopisnya sebagai duktal atau lobular. *Ductal Carcinoma In Situ* (DCIS) menyumbang sekitar 85% dari semua kanker payudara, sementara *Lobular Carcinoma In Situ* (LCIS) merupakan lesi premalignan yang berisiko tinggi sebagai pencetus kanker payudara. Mayoritas kasus karsinoma noninvasif ini dapat disembuhkan dengan pembedahan (Chisholm-Burns *et al.*, 2016).

II.4.2 Mekanisme Antikanker

Kanker secara luas dibagi menjadi tiga tahap: (1) inisiasi, di mana kerusakan DNA seluler dan mutasi terjadi paparan karsinogen dan karena kegagalan perbaikan DNA mekanisme; (2) promosi, di mana hiperproliferasi, meremajakan jaringan, dan peradangan terjadi karena ekspansi dari sel yang diinisiasi; dan (3) perkembangan, di

mana preneoplastik sel-sel membentuk tumor melalui ekspansi klon, lebih lanjut difasilitasi oleh peningkatan ketidakstabilan genom dan berubah ekspresi gen (Blowman *et al.*, 2018)

Bcl-2 (*B-cell lymphoma2*) adalah protein anti-apoptosis sebagian besar terlokalisasi di bagian dalam membran mitokondria, membran nukleus dan membran retikulum endoplasma. Bcl-2 terdapat dalam mitokondria dan terletak di dekat pori transisi permeabilitas mitokondrial (MPT), yang mengangkut molekul anionik dan kationik. Setiap perubahan permeabilitas pori-pori menyebabkan apoptosis. Bcl-2 mencegah perubahan permeabilitas pori-pori dan bertindak sebagai agen antiapoptosis. Bcl-2 juga menghambat pelepasan sitokrom C yang memainkan peran penting dalam aktivasi caspase cascade (protease sistein-aspartik) dan sangat penting untuk proses apoptosis (Hameed *et al.*, 2017).

Apoptosis adalah proses kematian sel yang dirancang secara genetis untuk menghilangkan suatu sel yang tidak diinginkan. Ada dua jalur utama apoptosis, intrinsik dan ekstrinsik. Jalur intrinsik dipicu oleh sinyal intraseluler dimana mitokondria memainkan peran kunci. Rangsangan sitotoksik seperti pertumbuhan penarikan faktor perkembangan dan obat antikanker mengaktifkan jalur intrinsik. Sebaliknya, jalur ekstrinsik melibatkan sinyal eksternal, yang berikatan dengan kematian sel reseptor pada permukaan sel yang mengarah ke pembentukan sinyal kematian yang diinduksi kompleks (Raghavan, 2017).

II.5 Analisis Bahan Alam dan Instrument Analisis

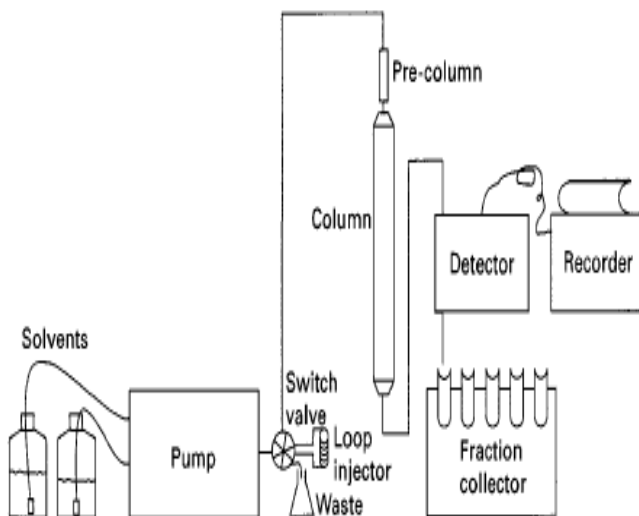
II.5.1 MPLC (Medium Preparative Liquid Chromatography)

Kromatografi cair tekanan sedang (MPLC) adalah salah satu dari berbagai teknik kromatografi kolom preparatif. Pemisahan tekanan ini untuk penggunaan ukuran partikel yang lebih kecil mendukung kemungkinan dan meningkatkan keragaman fase stasioner yang dapat digunakan. MPLC diperkenalkan pada tahun 1970 sebagai teknik yang efisien untuk pemisahan senyawa organik secara preparatif. MPLC mengatasi salah satu kelemahan utama kromatografi cair tekanan rendah (LPLC), yaitu pemuatan sampel yang terbatas. Metode pemisahan ini sekarang secara rutin digunakan di samping atau dalam kombinasi dengan alat preparatif umum lainnya: kromatografi kolom terbuka, kromatografi sela, LPLC atau kromatografi cair kinerja tinggi preparatif (HPLC) (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

Perbedaan antara tekanan rendah, tekanan sedang dan tekanan tinggi didasarkan pada rentang tekanan yang diterapkan dalam teknik-teknik ini dan tumpang tindih sering cukup besar. MPLC memungkinkan pemurnian jumlah senyawa yang besar dan, tidak seperti kromatografi kolom terbuka dan kromatografi *flash*, pemisahan yang lebih cepat dan lebih baik diperoleh. Pengepakan material dengan ukuran partikel yang lebih rendah di bawah tekanan meningkatkan kualitas pemisahan dan terlebih lagi fase padat dapat digunakan kembali. Kesederhanaan dan ketersediaan instrumentasi, bersama dengan daur ulang bahan pengepakan dan biaya perawatan

yang rendah, berkontribusi pada daya tarik teknik ini (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

Representasi skematik dari pengaturan MPLC sederhana ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar II.4 Instrumentasi MPLC (Hostettmann, 2000)

Instrumentasi terdiri dari pompa untuk pengiriman pelarut, sistem injeksi sampel, dan kolom yang dikemas sendiri. Pemisahan produk dapat diikuti secara manual dengan memantau dengan kromatografi lapis tipis (TLC) atau secara otomatis dengan detektor dan perekam yang terhubung ke kolom (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

a. Pompa

Pemisahan kromatografi 0,1- 100 g sampel dalam beberapa jam membutuhkan laju aliran mulai dari sekitar 5 hingga 200 mL dengan tekanan maksimal dari 40 bar. Kriteria untuk memilih pompa MPLC termasuk: kisaran laju aliran; ada atau tidaknya peredam denyut, yang menyediakan laju aliran reguler dan tekanan selama pemisahan dan meningkatkan reproduktifitas pemisahan; adanya tekanan perangkat *cut-off*; dan kehadiran gradien bekas. Beberapa produsen menyediakan pompa dengan tukar kepala piston, sehingga memungkinkan laju aliran 0,5-160 mL dengan tekanan hingga 40 bar (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

b. Kolom

Kolom adalah titik pusat saat mengoptimalkan pemisahan dan kriteria kromatografi preparatif seperti jumlah sampel yang harus dimurnikan, jumlah bahan pengepakan dan panjang diameter kolom, harus dipertimbangkan dengan hati-hati. MPLC kolom umumnya terbuat dari kaca tebal yang dilapisi plastik pelindung dan dapat menahan tekanan hingga 50 bar. Dimensi kolom tergantung pada sampel jumlah yang harus dipisahkan, mulai dari 0,1 g dengan kolom terkecil hingga 100 g dengan kolom besar (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

c. Detektor dan Perekam

Pemantauan pemisahan MPLC dapat dilakukan oleh TLC dari fraksi yang dikumpulkan. Deteksi *online* juga digunakan secara rutin dengan satu-panjang gelombang UV / Vis detektor. Kebanyakan detektor UV yang tersedia dirancang untuk tujuan analitis dan tidak banyak digunakan untuk pemisahan preparatif. Pemilihan deteksi panjang gelombang dimana penyerapan produk rendah juga bisa menjadi alternatif untuk menghindari deteksi kelebihan beban. Detektor Gow-Mac 80-800 LC-UV adalah detektor yang dirancang khusus untuk pemisahan preparatif (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

d. Pengumpul pecahan

Pengumpulan fraksi otomatis dapat dilakukan dengan menghubungkan kolektor pecahan ke kolom atau stop kontak detektor. Volume dari fraksi yang dikumpulkan tentu saja sangat bergantung pada diameter internal dari kolom dan laju aliran. Adanya puncak di dalam detektor atau koneksi ke eksternal memungkinkan koleksi fraksi termonitor. Dalam standarnya Pengaturan MPLC, sistem *Buchi* menyediakan sebagian kecil fraksi dengan kapasitas total 240 x 20 mL tabung, 120x 50 mL tabung atau 48x 250 mL tabung. Jenis ini fraksi telah terbukti sangat cocok untuk MPLC (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

e. Pengepakan Kolom

Pemilihan fase stasioner adalah parameter penting yang mempengaruhi kualitas pemisahan. Beberapa jenis bahan

pengepakan biasanya digunakan dalam MPLC dan berbagai faktor harus dipertimbangkan ketika memilih bahan kemasan:

1. Ukuran partikel
2. Panjang kolom
3. Tekanan operasi
4. Jenis sampel
5. Biaya.

fase diam yang digunakan adalah silika gel (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

f. Metode Pengemasan Kolom

Metode pengisian yang berbeda dijelaskan untuk pengepakan Kolom MPLC. Harus diisi kolom homogenitas optimal dan kepadatan yang baik (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

MPLC baru-baru ini menjadi banyak digunakan di farmasi, industri kimia dan makanan, dan banyak lagi. Aplikasi ditemukan dalam isolasi produk alami. Aplikasi yang telah dipilih yaitu transposisi HPLC analitis kondisi ke MPLC. MPLC telah dikonstruksikan sebagai alat kromatografi preparatif yang sangat baik sekarang secara rutin digunakan di banyak laboratorium. Penggunaan berbagai fase terikat di MPLC tidak lagi membatasi penggunaan teknik ini untuk isolasi zat lipofilik dengan silika gel. Berbagai macam jumlah sampel yang dapat dipisahkan dengan teknik ini, bersama dengan penggunaan TLC dan HPLC analitis dalam pencarian kondisi optimal, juga merupakan manfaat utama dari metode kromatografi ini. Namun, pengemasan kolom yang baik dan memadai persiapan

sampel adalah prasyarat untuk berhasil melakukan pemisahan. Perkembangan lebih lanjut dari MPLC ini adalah menyangkut masalah deteksi dengan optimalisasi detektor yang dapat mengakomodasi beban sampel yang tinggi (Hostettmann dan Terreaux, 2000).

II.5.2 NMR

Elusidasi struktur molekul organik dapat dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi dengan instrumen yang digunakan yaitu : spektrofotometer ultraviolet (UV), infrared (IR), massa (MS), *Nuclear Magnetic Resonance* (^{13}C -NMR, ^1H NMR), *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT), ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (HMQC), ^1H - ^1H *Homonuclear Correlated Spectroscopy* (COSY), dan ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Bond 2D Connectivity* (HMBC) (Santoni, 2009).

Spektroskopi ^1H -NMR cukup banyak digunakan oleh kimiawan organik. Spektroskopi ini didasarkan pada kenyataan bahwa setiap kelompok proton (H) dalam molekul organik akan beresonansi pada frekuensi yang spesifik. Hal ini disebabkan kelompok proton suatu molekul organik dikelilingi elektron yang berbeda (lingkungan elektroniknya berbeda). Makin besar kerapatan elektron yang mengelilingi inti maka makin besar pula medan magnet yang digunakan. Karena setiap atom H (proton) suatu molekul organik mempunyai lingkungan elektronik (kimia) yang berbeda maka akan menyebabkan frekuensi resonansi yang berbeda (Santoni, 2009). Pergeseran kimia, dilambangkan dengan δ , menyatakan seberapa

jauh (satuan ppm) proton tersebut digeser dari proton standar Tetrametilsilana (TMS) ($\delta = 0$ ppm), terhadap frekuensi spektrometer yang digunakan. Pada skala δ maka untuk TMS didefinisikan sebagai (0,0 ppm) dengan skala (0-10) ppm. Beberapa spektroskopi menggunakan skala τ (tau) yang besarnya adalah (10- δ) ppm. Pada spektroskopi ^1H -NMR, maka skala δ dan τ dicatat dari kiri ke kanan pada kertas spektrum (Santoni, 2009).

^{13}C -NMR adalah suatu teknik yang dapat digunakan untuk menentukan susunan (jumlah) atom karbon didalam suatu molekul organik hasil isolasi atau hasil transfortasi dan sintesis (Santoni, 2009).

Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan analisa kuantitatif tapi penggunaannya dalam penentuan struktur senyawa organik masih terbatas. Senyawa-senyawa yang dapat dianalisa dengan spektrofotometer UV-VIS adalah senyawa-senyawa yang mempunyai gugus kromofor. Parameter yangdiperoleh dari spektrofotometer UV-VIS adalah harga panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dan absorban (A) dari senyawa yang dianalisa (Santoni, 2009).

Spektrofotometer inframerah dapat digunakan untuk menentukan gugus fungsi yang terdapat pada senyawa organik. Spektrofotometer inframerah berfungsi mengukur perubahan vibrasi ikatan antara atom-atom yang ada dalam senyawa organik. Parameter yang ditentukan adalah bilangan gelombang dari puncak-puncak yang muncul pada spektrum inframerah (Santoni, 2009).

Spektroskopi massa adalah teknik analisis untuk menentukan komposisi dasar dari suatu sampel atau molekul. Spektrometer massa digunakan untuk penentuan berat molekul suatu senyawa (Santoni, 2009).

HMQC (*Heteronuclear multiple quantum coherence*) merupakan salah satu jenis NMR dua dimensi yang dapat digunakan untuk mengetahui jenis proton dalam satu ikatan, sehingga dari data ini dapat ditentukan pula karbon yang mengikat proton dan mana karbon yang kuartener. Dari data ini juga diketahui nilai geseran kimia dari karbon yang memiliki proton (Breitmaier, 2002)

HMBC (*Heteronuclear multiple bond correlation*) merupakan salah satu jenis NMR dua dimensi yang dapat digunakan untuk mengetahui hubungan antara proton dengan karbon yang berjarak 2 sampai 3 ikatan sehingga dapat diketahui atom karbon tetangga (Breitmaier, 2002).

Spektrum H-H COSY dapat memberikan korelasi H dengan H tetangga melalui kontur yang muncul pada spektrum. Dari spektrum ini dapat diketahui proton-proton yang berdekatan pada suatu senyawa. Spektroskopi H-H COSY adalah metode yang paling mudah pada 2D NMR (Supratman, 2010).

DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) dapat membedakan *signal* karbon metil, metilen, metin dan karbon kuartener. Karbon metil dan metin menunjuk ke atas, karbon metilen ke bawah dan karbon kuartener hilang.

II.5.3 Fraksinasi

Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah n-heksan, etil asetat, dan metanol. Untuk menarik lemak dan senyawa non polar digunakan n-heksan, etil asetat untuk menarik senyawa semi polar, sedangkan metanol untuk menarik senyawa polar. Dari proses ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga (Mutiasari, 2012).

Ekstrak awal merupakan campuran dari berbagai senyawa. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama. Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair atau dengan kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK) (Sarker, 2006).

II.5.4 Kromatografi

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dengan arah tertentu dan didalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau

kerapatan muatan ion. Dengan demikian masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan sebagai metode analitik (Depkes RI, 2009).

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi diantara dua fase, satu diantaranya diam (fase diam), yang lainnya bergerak (fase gerak). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen (Depkes RI, 2009).

II.5.5 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu contoh kromatografi adsorpsi. Senyawa yang dipisahkan dengan kromatografi kolom memiliki mekanisme yang sama dengan jenis kromatografi lain yaitu berkaitan dengan perbedaan gaya-gaya antarmolekul dalam sampel dengan fase gerak dan antara komponen dengan fasa diam. Prinsip kerja kromatografi kolom yaitu zat cair sebagai fasa gerak akan membawa cuplikan senyawa mengalir melalui fasa diam sehingga terjadi interaksi berupa adsorpsi senyawa-senyawa tersebut oleh padatan dalam kolom. Kecepatan bergerak suatu komponen dalam cuplikan tergantung pada seberapa besar/lama komponen tersebut tertahan oleh padatan penyerap dalam kolom. Hasil yang diperoleh berupa fraksi-fraksi senyawa (eluat) yang ditampung pada bagian bawah kolom (Rubiyanto, 2016).

II.5.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah suatu teknik pemisahan komponen-komponen campuran suatu senyawa yang melibatkan partisi suatu senyawa diantara padatan penyerap (adsorben, fase diam) yang dilapisi pada plat kaca atau aluminium dengan suatu pelarut (fase gerak) yang mengalir melewati adsorben (padatan penyerap). Pengaliran pelarut dikenal sebagai proses pengembangan oleh pelarut (elusi). KLT mempunyai peranan penting dalam pemisahan senyawa organik maupun senyawa anorganik, karena relatif sederhana dan kecepatan analisisnya. Di dalam analisis dengan KLT, sampel dalam jumlah yang sangat kecil ditotolkan menggunakan pipa kapiler di atas permukaan pelat tipis fase diam (adsorben), kemudian pelat diletakkan dengan tegak dalam bejana pengembang yang berisi sedikit pelarut pengembang. Oleh aksi kapiler, pelarut mengembang naik sepanjang permukaan lapisan pelat dan membawa komponen-komponen yang terdapat pada sampel (Atun, 2014).

Fase diam yang digunakan dalam KLT adalah bahan penyerap. Penyerap yang umum adalah silika gel, aluminium oksida, selulosa, kiselgur, selulosa dan turunannya. Dua sifat yang penting dari penyerap adalah besar partikel dan homogenitasnya, karena adhesi terhadap penyokong sangat tergantung pada hal tersebut. Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya (Rohman, 2007).

Pemilihan fase gerak yang tepat merupakan langkah yang sangat penting untuk keberhasilan analisis dengan KLT. Umumnya fase

gerak dalam KLT ditemukan dengan coba-coba dan jarang sekali yang didasarkan pada pengetahuan yang mendalam. Sifat-sifat pelarut pengembang juga merupakan faktor dominan dalam penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Umumnya kemampuan suatu pelarut pengembang untuk menggerakkan senyawa pada suatu adsorben berhubungan dengan polaritas pelarut (Atun, 2014).