

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL RIMPANG TEMU KUNCI (*Kaempferia pandurata* Roxb)
YANG AKTIF PADA PROTEIN GLIOMA (GLI) MENGGUNAKAN SEPACORE**

**RAMDHAYANI
N111 08 103**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL RIMPANG TEMU KUNCI (*Kaemperia pandurata Roxb*)
YANG AKTIF PADA PROTEIN GLIOMA (GLI) MENGGUNAKANSEPCORE**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**



**RAMDHAYANI
N111 08 103**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL RIMPANGTEMU KUNCI (*Kaemperia pandurata Roxb*)
YANG AKTIF PADA PROTEIN GLIOMA (GLI) MENGGUNAKANSEPCORE**

**RAMDHAYANI
N 111 08 103**

Disetujui oleh :



Pembimbing Pertama,

Pembimbing Kedua,

YusnitaRifai,S.Si.,M.Pharm.,Ph.D.,Apt.
NIP. 19751117 200012 2 001

Abd.Rahim.,S.Si.,M.Si.,Apt.
NIP. 19771111 2008121 001

Pada tanggal, 30 Juli 2013

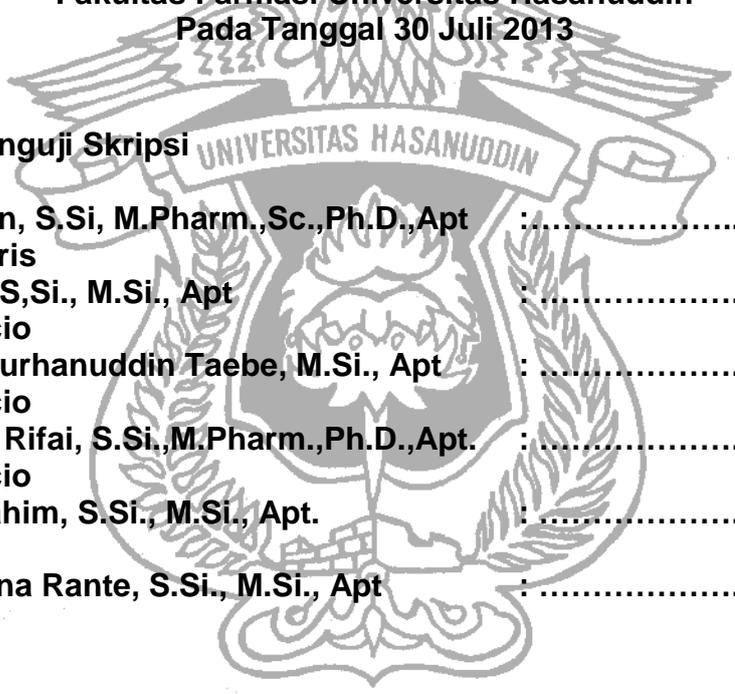
PENGESAHAN

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL RIMPANG TEMU KUNCI (*Kaemperia pandurata Roxb*)
YANG AKTIF PADA PROTEIN GLIOMA (GLI) MENGGUNAKAN SEPACORE**

Oleh :
RAMDHAYANI
N 111 08 103

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal 30 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi

- 
1. Ketua
Subehan, S.Si, M.Pharm., Sc., Ph.D., Apt :
 2. Sekretaris
Usmar, S.Si., M.Si., Apt :
 3. Ex Officio
Drs.H.Burhanuddin Taebe, M.Si., Apt :
 4. Ex Officio
Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. :
 5. Ex Officio
Abd. Rahim, S.Si., M.Si., Apt. :
 6. Anggota
Dr.Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt :

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 30 Juli 2013

Penyusun,

Ramdhayani

UCAPAN TERIMA KASIH



Alhamdulillah, tiada kata yang lebih patut diucapkan oleh seorang hamba yang beriman selain ucapan puji syukur ke hadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Pengasih, Pemilik segala ilmu, karena atas petunjuk-Nya maka skripsi ini dapat diselesaikan sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar kesarjanaan pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Terima kasihku terucap dari hati yang paling dalam, serta rasa sayang penulis haturkan kepada kedua orang tua penulis ayahanda **H. Muhammad Arifin SE** dan ibunda **Dra. Hj Nurhayati** atas segala pengorbanan yang telah dilakukan, baik itu pengorbanan moril maupun materil, demi untuk melihat penulis bisa merengkuh keberhasilan. Penulis sadar bahwa tidak ada yang dapat penulis lakukan untuk membalas pengorbanan tersebut, tetapi penulis hanya dapat memanjatkan do'a kepada Allah SWT, sesungguhnya Allah Maha Tahu dan Maha Bijaksana. *“Sayangilah kedua orang tua hamba, sebagaimana mereka telah menyayangi hamba pada waktu kecil. Ampunilah pula dosa mereka, ya Allah.*

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga penulis sampaikan kepada Bapak Drs.H Burhanuddin Taebe M.Si.,Apt selaku pembimbing utama penulis, Ibu Yusnita Rifai S.Si,M.Pharm,Ph.D,Apt

selaku pembimbing pertama penulis, dan Bapak Abdul Rahim S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing kedua yang telah bisa mengayomi sebagai orang tua kedua penulis, bisa sebagai sahabat yang bersedia menerima segala bentuk curhatannya penulis, semoga Allah SWT membalas segala kebaikan itu, amin.

1. Kepada Dekan Fakultas Farmasi, Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA; , pembantu dekan I Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si. Apt, pembantu dekan II Ibu Prof. Dr. rer. nat. Hj. Marianti A. Manggau. Apt, dan pembantu dekan III Bapak Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si, Apt. Ibu Mufidah S.Si., M.Si., Apt selaku penasehat akademik penulis dan bapak/ibu dosen Fakultas Farmasi UNHAS terima kasih atas ilmu, nasehat, dan saran yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan ini. Serta seluruh staff pegawai Fakultas Farmasi UNHAS serta para laboran di setiap laboratorium yang telah banyak membantu penulis dalam dunia kampus.
2. Kepada Bapak Subehan S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. Bapak Usmar S.Si., M.Si Apt. Ibu Dr. Herlina Rante S.Si., M.Si., Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran kepada penulis
3. Kepada adik penulis Rezki Darmawan Arifin dan keluarga besar penulis yang telah memberikan Doa, dan memotivasi untuk menyelesaikan skripsi ini.

4. Kepada Nur Hasanah S.Si, Defi liestiawati P S.Si, Fitri rejky amelia S,Si, Amirah Pratiwi S.Si, Hartanti Probo Rini S.Si, Sri Wahyuningsih S.Si terima kasih telah menjadi sahabat-sahabat terbaik penulis yang selalu ada disaat senang maupun susah,dan Sazidha Febria abay S.Si yang telah banyak membantu dari awal penelitian hingga akhir penelitian dan menjadi pendengar yang baik untuk semua keluh kesah penulis.
5. Kepada Salman Made terimakasih untuk pengertian,kesabaran dan semangat yang diberikan kepada penulis selama ini.
6. Kepada teman seperjuangan penelitian penulis, Indri Hafsari S.Si dan Nurhidaya S.Si terimakasih untuk kesabaran dan rasa memahami yang lebih selama ini. Kepada kak Ismail S.Si,Apt, kak Aminullah S.Si,Apt terimakasih telah membantu dalam mengoperasikan Sepacore[®].
7. Kepada sahabat-sahabat SMA penulis Farra Dwi Sasmi,Sarni widiatuty Ramadhani, Talha Tri Rejeki,Vonny Iriani Rammang,Venny wijaya fabanyo,dan Noviane Christina terimakasih untuk canda tawa yag diberikan selama ini dan selalu bisa memberikan ketenangan untuk penulis.
8. Kepada saudara/iku angkatan 2008 dan warga Kemafar Fakultas Farmasi UNHAS. Terima kasih banyak atas semua persaudaraan dan persahabatan yang telah kalian tanamkan dalam setiap relung

hidupku, begitu juga canda dan tawa yang telah kalian tuliskan dalam setiap episode perjalanan hidup penulis.

9. Terimakasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebut satu per satu dan telah banyak membantu penulis, baik didalam menyusun skripsi ini ataupun dalam kehidupan sehari-hari. Semoga diberi kemudahan oleh Allah SWT dalam menjalani hidup kalian.

Penulis sangat menyadari, dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari bentuk kesempurnaan, sehingga saran, dan kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis kedepannya.

Makassar, 30 Juli 2013

Penulis,

Ramdhayani

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian profil kromatogram ekstrak metanol temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) yang aktif pada protein Glioma (GLI) menggunakan Sepacore. Penelitian ini bertujuan untuk menambah informasi profil kromatogram kandidat obat anti kanker yang bekerja pada protein target *GLI* dan untuk mengetahui profil kromatogram dari senyawa tanaman temu kunci yang aktif pada protein *GLI* dengan menggunakan alat Sepacore dengan waktu retensi dari senyawa-senyawa hasil isolasi tanaman temu kunci. Temu kunci yang diteliti, diperoleh dan dideterminasi oleh UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur. Sampel temu kunci diberi suspensi GLI-dynabeads dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000rpm selama 10 menit dan dijaga suhunya pada -4°C. Filtrat temu kunci kemudian dirangkaikan dengan alat Sepacore menggunakan *catridge PP 12/150* dengan kecepatan alir 10 ml/menit, dan tekanan mulai 0 sampai 100 dan menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksan. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah waktu retensi (t_R) (menit). Hasil analisis menunjukkan bahwa pada kromatogram temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) terdapat delapan puncak.

ABSTRACT

Study on chromatogram profiles of methanol extract from Temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) which active at glioma protein (GLI) using Sepacore . This study aims to add information of chromatogram profile for has been done anti-cancer drug candidates which working at GLI targeted protein and to discover the chromatogram profiles of Temu kunci plant which active on GLI protein with the help of Sepacore based on retention time from the isolated compound by material medica, Batu town, East java. Temu kunci methanol extract added with GLI-Dynabeads suspension and sentrifuged at 12000 rpm for 10 minutes and maintained at -4°C temperature. Temu kunci pellet (*Kaempferia pandurata* Roxb) then analyzed using Sepacore tool (catridge pp12/150) with flow rate of 10ml/minute, and the ethyl acetate and n-hexane were as a solvent. Parameter used in this study is the retention time (t_R) (minute). The result showed that Temu kunci's (*Kaempferia pandurata* Roxb) chromatogram profile showed eight peak's.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Uraian Tanaman	6
II.1.1 Klasifikasi	6
II.1.2 Nama Daerah	6
II.1.3 Morfologi.....	7
II.1.4 Kandungan Kimia	8
II.1.5 Khasiat	9
II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam	9
II.2.1 Definisi Ekstrak	9
II.2.2 Definisi Ekstraksi	10
II.2.3 Tujuan Ekstraksi	10
II.2.4 Jenis-jenis Ekstraksi	10
II.2.5 Metode Ekstraksi Secara Maserasi	11

II.3	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	11
II.4	Waktu Retensi (t_R)	13
II.5	Bioassay	14
II.6	Kanker	14
II.7	Hedgehog	16
II.8	Dynabeads	17
II.9	GLI-GST (<i>Gluthatione Sepharose Transferase</i>)	18
BAB III	PELAKSANAAN PENELITIAN	20
III.1	Alat dan Bahan	20
III.2	Penyiapan Sampel Penelitian.....	20
III.2.1	Pengambilan Sampel	20
III.3	Ekstraksi.....	20
III.4	Penyiapan dan Pengaktifan GLI-Dynabeads	21
III.5	Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	21
III.6	Penapisan ekstrak menggunakan Sepacore [®]	22
BAB IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	23
IV.1	Hasil Penelitian	23
IV.2	Pembahasan	24
BAB V	PENUTUP	28
V.1	Kesimpulan	28
V.2	Saran	28
	DAFTAR PUSTAKA	29
	LAMPIRAN I	32

LAMPIRAN II	33
LAMPIRAN III	34
LAMPIRAN IV	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Kromatogram ekstrak metanol rimpang Temu Kunci (<i>Kaempferia pandurata</i> Roxb) Sepacore	23
2. KLT ekstrak metanol rimpang Temu Kunci (<i>Kaempferia pandurata</i> Roxb) hasil Sepacore	34
3. Rimpang Temu Kunci (<i>Kaempferia pandurata</i> Roxb)	35
4. Endapan ekstrak metanol rimpang Temu Kunci (<i>Kaempferia pandurata</i> Roxb) yang telah diserbukan	35
5. Alat Sepacore (Buchi®)	36
6. Fraksi-fraksi ekstrak metanol rimpang Temu Kunci (<i>Kaempferia pandurata</i> Roxb) setelah di partisi menggunakan Sepacore	36
7. Catridge PP 12/150	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja	32
2. Isi tiap buffer untuk penyiapan GLI-Dynabeads.....	33
3. Hasil kromatogram	34
4. Foto pelaksanaan penelitian.....	35

BAB I

PENDAHULUAN

Obat tradisional telah lama dikenal dan digunakan sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah kesehatan jauh sebelum pelayanan kesehatan formal dengan obat-obat modern menyentuh masyarakat. Obat tradisional sebagian besar berasal dari tumbuhan, sisanya dari hewan dan mineral (1).

Salah satu suku tumbuhan yang anggotanya banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional adalah Zingiberaceae, memiliki 47 marga dan 1400 jenis, baik yang tumbuh di daerah tropis maupun subtropis. Delapan jenis di antaranya terdapat di Indonesia dan digunakan sebagai bahan obat (1).

Penyebaran suku Zingiberaceae kebanyakan terbatas di belahan timur bumi, khususnya di Indo-Malaya, yang merupakan tempat asal sebagian besar anggotanya (2). Salah satu jenis dari suku Zingiberaceae yang tumbuh di Indonesia adalah *Kaempferia pandurata* Roxb (temu kunci), mengandung panduratin A sebagai komponen utamanya bersifat sitotoksik (3). Rimpang temu kunci mengandung juga minyak atsiri yaitu metilsinamat, kamper, sineol, terpena, saponin dan flavonoid. Senyawa-senyawa yang mempunyai prospek cukup baik sebagai bahan obat atau kosmetik biasanya berasal dari golongan flavonoid, kurkumin, limonoid, vitamin C, vitamin E (tokoferol), dan katekin yang bisa digunakan sebagai

obat antikanker (4). Kandungan utamanya yang bersifat sebagai sitotoksik adalah panduratin A (5).

Yun *et all* telah membuktikan bahwa panduratin A yang merupakan derivat dari kalkon mempunyai berbagai efek biologis seperti antiinflamasi, analgetik, dan antioksidan. Namun penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa panduratin A berpotensi sebagai anti kanker, sebagaimana dikutip oleh Septistyani,dkk (5). Kanker atau neoplasma ganas adalah penyakit yang ditandai dengan kelainan siklus sel khas yang menimbulkan kemampuan sel untuk: tumbuh tidak terkendali (pembelahan sel melebihi batas normal), menyerang jaringan biologis di dekatnya, bermigrasi ke jaringan tubuh yang lain melalui sirkulasi darah atau sistem limfatik disebut metastasis (6).

Beberapa penyebab kanker adalah mutasi sel DNA dan beberapa signal, di antaranya *TNF (Tumor Necrosis Factor)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*, dan *Hedgehog (Hh)*. Signal *Hh* ini mengambil nama dari ligan polipeptida, suatu signal molekul antar sel yang ditemukan pada *Drosophila* . *Hh* adalah salah satu produk segmen dari gen polaritas *Drosophila*, yang terlibat dalam membangun embrio. Sangat berperan penting pada tahap akhir dari embriogenesis dan metamorfosis (7).

Signal *Hh* dimulai dengan pengikatannya pada membran reseptor *patched (PTCH)*, sehingga mengakibatkan penekanan aktivitas *proto-oncogen-smoothed (SMO)* dan terjadi pelepasan gen *GLI*. Akibat dari kelebihan *GLI* dapat memicu terjadinya karsinoma, medula blastoma, kanker pankreas,

kanker prostat (8). Sehingga target protein *GLI* dapat digunakan untuk penemuan obat anti kanker.

Potensial inhibitor *Hh* sebagai obat anti kanker sudah banyak dipublikasi, dan sebagian besar menjadikan *SMO* protein sebagian target. Namun tidak banyak bahan alam yang menjadikan *GLI* sebagai target. Karena mampu menghambat signal *Hh*, maka peranan inhibitor *Hh* sebagai obat anti kanker, isolasi dan pengembangan senyawa aktif dari bahan alam ini menjadi kebutuhan penting untuk kesehatan masyarakat umum (9).

Untuk penarikan senyawa aktif dari ekstrak metanol tanaman agar terjerap pada target protein yang diinginkan, digunakan *Magnetic beads* yang dapat bersifat sebagai magnet, dengan menggunakan alat Sepacore dapat memisahkan senyawa-senyawa murni hasil immobilisasi target protein *GLI* pada *magnetic beads* yang telah didapatkan. Isolasi ekstrak metanol yang aktif akan menghasilkan bahan baku obat anti kanker yang bekerja spesifik pada protein *GLI* (10).

Sepacore termasuk dalam kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), prinsip kerja KCKT sebenarnya tidak berbeda dengan prinsip-prinsip kromatografi yang lain, yaitu pemisahan komponen-komponen sampel dengan cara melewatkan sampel pada suatu kolom,yang selanjutnya dilakukan pengukuran pada masing-masing komponen tersebut dengan suatu detector(10). Keuntungan dari penggunaan alat Sepacore adalah mempercepat proses pemurnian dengan cara mengoptimasi pemisahan

hanya dengan sekali proses, pemisahan menggunakan resolusi yang tinggi dengan kualitas silika yang baik dan mengoptimalkan proses pengumpulan.

Keuntungan dari metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode baru yang disebut sebagai "*Target oriented approach*" (isolasi berbasis target) adalah bahan akan bekerja spesifik pada organ target, rendamen yang dihasilkan lebih dari 2 mg, tidak memungkinkan untuk adanya zat pengotor sehingga lebih murni. Metode ini mengurangi proses fraksinasi dan Bioassay pada metode konvensional (*Bioassay-guided isolation*) sehingga lebih efektif (12).

Penanda *Hedgehog (Hh)* telah ditemukan dari peneliti sebelumnya dari tanaman *Vallis glabra* Linn yaitu Acochimperoside P, 2'-acetate yang mengidentifikasi terpenoid, flavonoid, glycosida pada *Acacia pennata* Mill (13,14). Pada ekstrak metanol *Excoecaria agallocha* telah diidentifikasi enam glukosida flavanoid (10).

Oleh karena dari hasil penapisan terhadap tanaman golongan Zingiberaceae dipercaya bahwa temu kunci salah satu tanaman yang aktif pada protein *GLI*, maka dilakukan pemisahan terhadap ekstrak metanol temu kunci dengan menggunakan alat Sepacore sekaligus untuk mengetahui profil kromatogramnya.

Berdasarkan uraian diatas, maka telah dilakukan penelitian profil kromatogram dari senyawa tanaman temu kunci yang aktif pada protein *GLI* dengan menggunakan alat Sepacore yang dimaksudkan untuk

menambah informasi tentang obat anti kanker yang bekerja pada protein target *GLI*. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui profil kromatogram dari senyawa tanaman temu kunci yang aktif pada protein *GLI* dengan menggunakan alat Sepacore dengan waktu retensi dari senyawa-senyawa hasil isolasi tanaman temu kunci.

BAB II

TINJUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman

II.1.1 Klasifikasi

Kerajaan	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingberaceae
Marga	: Kaempferia
Jenis	: <i>Kaempferia Pandurata</i> Roxb (13)

II.1.2 Nama Daerah

Sumatera	: Koncih
Minangkabau	: Tamu kunci
Madura	: Konce
Jawa tengah	: Kunci
Bima	: Dumu kunci
Makassar	: Tamu konci
Ambon	: Tumu kunci
Ternate	: Tamputi (13)

II.1.3 Morfologi

Temu kunci berperawakan herba rendah, merayap di dalam tanah. Dalam satu tahun pertumbuhannya 0,3-0,9 cm. Batangnya merupakan batang asli di dalam tanah sebagai rimpang, berwarna kuning coklat, aromatik, menebal, berukuran 5-30 x 0,5-2 cm. Batang di atas tanah berupa batang semu (pelepah daun). Daun tanaman ini pada umumnya 2-7 helai, daun bawah berupa pelepah daun berwarna merah tanpa helaian daun. Tangkai daun tanaman ini beralur, tidak berambut, panjangnya 7-16 cm, lidah-lidah berbentuk segitiga melebar, menyerupai selaput, panjang 1-1,5 cm, pelepah daun sering sama panjang dengan tangkai daun; helai daunnya tegak, bentuk lanset lebar atau agak jorong, ujung daun runcing, permukaan halus tetapi bagian bawah agak berambut terutama sepanjang pertulangan, warna helai daun hijau muda, lebarnya 5-11cm. Bunga tanaman ini berupa susunan bulir tidak berbatas, di ketiak daun, dilindungi oleh 2 spatha, panjang tangkai 41 cm, umumnya tangkai tersembunyi dalam 2 helai daun terujung. Kelopak bunganya 3 buah lepas, runcing. Mahkota bunganya 3 buah, warnanya merah muda atau kuning-putih, berbentuk tabung 50-52 mm, bagian atas tajuk berbelah-belah, berbentuk lanset dengan lebar 4 mm dan panjang 18 mm. Benang sarinya 1 fertil besar, kepala sarinya bentuk garis membuka secara memanjang. Lainnya berupa bibir-bibir , bulat telur terbalik tumpul, merah muda atau kuning lemon, gundul, 6 pertulangan, dan ukurannya 25x7 cm. Putik bunganya berupa bakal buah 3 ruang, banyak biji dalam setiap ruang (13).

Tanaman ini banyak tumbuh dari daerah tropis dataran rendah. Waktu berbunganya pada bulan Januari-Februari, April-Juni. Daerah distribusi dan habitat tanaman ini adalah tumbuh liar pada dataran rendah, di hutan-hutan jati. Tanaman ini tumbuh baik pada iklim panas dan lembab pada tanah yang relatif subur dengan pertukaran udara dan tata air yang baik. Pada tanah yang kurang baik tata airnya (sering tergenang air, atau becek pertumbuhan akan terganggu dan rimpang cepat busuk). Perbanyakannya temu kunci dapat dilakukan dengan pemotongan rimpang menjadi beberapa bagian (tiap bagian terdapat paling sedikit 2 mata tunas) dan penanaman dilakukan pada jarak tanam 3000 cm (13).

II.1.4 Kandungan Kimia

Rimpang 1,2 % minyak atsiri (rimpang segar 0,06%-0,32% minyak atsiri); terdiri dari monoterpen, seskuiterpen, turunan fenilpropana antara lain geraniol, neral, kampora, zingiberen, d-pinen, kamfen, 1,8-sineol (eukoliptol), d-borneol, geraniol, osimen, dimetoksi-4 (2-propinil), miristin, linalil propanat, asam sinamat, panduratin A. Asam Kavisinat-falavonoid: pinosembrin (2,3-dihidrokrisin), 2',6dihidroksi-4'-metoksi kalkon, pinotrobin (5 hidroksi-7-metoksi flavonon), alpinetrisin, kardamomin, 2,4'-dihidroksi-6'-metoksi kalkon, boesenbergin A, 5,7-dimetoksinflavon (13).

II.1.5 Khasiat

Secara umum, masyarakat menggunakan rimpang temu kunci sebagai peluruh dahak atau untuk menanggulangi batuk, peluruh kentut,

penambah nafsu makan, menyembuhkan sariawan, bumbu masak, dan pemacu keluarnya Air Susu Ibu (ASI). Minyak atsiri rimpang temu kunci juga berefek pada pertumbuhan *Entamoeba coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. Di Thailand, rimpang temu kunci biasa digunakan sebagai bumbu masak. Selain itu, tanaman ini juga telah digunakan sebagai obat aprodisiac, disentri, antiinflamasi, kolik, serta untuk menjaga kesehatan tubuh. Di Malaysia, rimpang temu kunci digunakan sebagai obat sakit perut dan dekoksi pada wanita pasca melahirkan (13).

II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam

II.2.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (14).

II.2.2 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian komponen kimia atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis hewan termasuk biota laut. Komponen kimia yang terdapat pada tanaman dan hewan pada umumnya mengandung senyawa-senyawa yang mudah larut dalam pelarut organik.

Proses ekstraksi komponen kimia dalam sel tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam dan diluar sel, maka larutan yang pekat atau berkonsentrasi tinggi didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel (15).

II.2.3 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah menarik komponen kimia yang terdapat dari bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut dengan pelarut organik tertentu (15).

II.2.4 Jenis-jenis Ekstraksi

Jenis-jenis ekstraksi yang sering digunakan adalah :

- a. Secara dingin, yaitu maserasi, perkolasi dan soxhletasi. Ekstraksi secara dingin digunakan untuk sampel yang lunak, tidak tahan panas, tidak mudah mengembang dalam cairan penyari.
- b. Secara panas, yaitu refluks, infuse, dekokta, dan destilasi uap air. Ekstraksi secara panas digunakan untuk sampel yang mempunyai dinding sel yang tebal (15).

II.2.5 Metode Ekstraksi Secara Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan akan masuk

ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan diluar sel, maka larutan yang pekat atau berkonsentrasi tinggi akan didesak keluar, peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel.

- c. Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari. Pada penyarian dengan cara maserasi perlu dilakukan pengadukan. Pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan diluar butir serbuk simplisia, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan didalam dan diluar sel (15).

II.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), merupakan suatu teknik kromatografi dengan fase gerak cairan dan fase diam cairan atau padat. Parameter KCKT yang digunakan untuk analisis kuantitatif ialah waktu retensi atau volume retensi. Perhitungan kuantitatif didasarkan pada pengukuran tinggi puncak atau luas puncak suatu komponen zat. Populernya penggunaan KCKT disebabkan teknik ini memiliki beberapa keunggulan, yaitu mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis, kepekaan yang tinggi dan resolusi yang baik. Selain itu, kolom dapat digunakan kembali, dapat menggunakan

bermacam-macam detektor, dan dapat menghindari terjadinya dekomposisi atau kerusakan bahan yang dianalisis. Berdasarkan perbedaan fase, KCKT terbagi menjadi dua, yaitu fase normal dan fase terbalik. Fase normal ialah fase diam yang berupa senyawa polar dan fase gerak senyawa nonpolar. Sementara fase terbalik ialah fase diam yang berupa senyawa nonpolar dan fase gerak senyawa polar (16). Menurut Gritter *et al*, kromatografi menggunakan fase terbalik sehingga senyawa polar akan lebih baik pemisahannya, senyawa ionik dapat dipisahkan, dan air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada fase gerak. Susunan peralatan KCKT tidak banyak berbeda detektor UV 254 nm. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan kisaran yang lebih luas. Detektor indeks refraksi juga digunakan secara luas, terutama pada kromatografi eksklusi, tetapi umumnya kurang sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV. Detektor-detektor lain yang digunakan antara lain detektor fluoresensi, spektroskopi massa, dan berkas fotodiode. Dengan kromatografi gas-cair. Komponen utama pada KCKT antara lain reservoir pelarut untuk fase gerak, pompa, pencampur gradien, injektor, kolom, detektor, rekorder, dan integrator.

Detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitivitas yang tinggi, derau (*noise*) yang rendah, kisaran respon linear yang luas, dan memberi

respons untuk semua tipe senyawa. Detektor KCKT yang umum digunakan ialah Detektor berkas fotodioda (PDA) UV telah banyak digunakan untuk menganalisis residu antibiotik berdasarkan serapan pada daerah spektrum ultraviolet sampai sinar tampak (16).

II.4 Waktu Retensi (t_R)

Waktu retensi (t_R) adalah selang waktu yang diperlukan oleh linarut (solut) mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor (17).

Disamping waktu tambat untuk linarut, dikenal pula waktu tambat untuk pelarut pengembang atau pengembang campuran yang dinyatakan sebagai t_M . Harga t_M akan lebih kecil dari harga t_R karena yang akan lebih dahulu mencapai ujung kolom adalah pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur (17).

Waktu tambat linarut dikurangi waktu tambat pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur disebut waktu tambat yang terkoreksi yang dinyatakan sebagai t_R .

II.5 Bioassay

Bioassay merupakan metode pengujian aktivitas suatu senyawa dari bahan alam maupun sintetik menggunakan makhluk hidup. Bioassay terdiri dari banyak metode diantaranya yaitu uji toksisitas, uji antimikotik, uji daya hambat dll. Berdasarkan hasil bioassai tersebut dapat dilakukan isolasi senyawa dari bahan alam atau disebut *Bioassay guided isolation* (18).

Namun, ada salah satu metode penemuan obat yang baru yang diperkirakan dapat menggantikan metode *bioassai* ini, yaitu *target-oriented-approach*. *Target-oriented-approach* adalah metode pemisahan senyawa berdasarkan target (protein) yang diinginkan.

Keuntungan dari metode *target-oriented-approach* adalah pengaplikasian yang lebih mudah, menghasilkan senyawa-senyawa yang spesifik, lebih murni dan bebas dari pengotor, tidak banyak menghabiskan pelarut dan menghasilkan rendamen yang lebih banyak, yaitu >2 mg. Namun, metode ini belum terlalu dipakai secara umum karena masih dalam tahap penelitian secara *in-vivo* dan *in-vitro*.

II.6 Kanker

Kanker merupakan masalah kesehatan dari banyak negara di dunia dan termasuk penyakit yang menjadi perhatian serius pada bidang kedokteran. Hal ini disebabkan oleh jumlah korban yang terus meningkat dari tahun ke tahun dan belum ditemukan cara yang efektif untuk pengobatannya (19). Pengobatan kanker secara medis yang selama ini dilakukan adalah melalui pembedahan (operasi), penyinaran (radiasi) dan terapi kimia (kemoterapi). Salah satu yang menjadi perhatian adalah kemoterapi, yaitu penggunaan bahan-bahan bioaktif dari hasil sintesis atau isolasi bahan alam. Penggunaan bahan bioaktif dari isolasi bahan alam terus dikembangkan sampai saat ini karena sifatnya yang "*renewable*", mudah terdekomposisi dan dapat dikeluarkan dari dalam tubuh, sedangkan bahan sintetis dapat tertinggal atau menjadi residu yang

berbahaya bagi tubuh. Hal ini menyebabkan pelacakan senyawa-senyawa antikanker dari bahan alam banyak dilakukan, untuk mendapatkan senyawa yang berpotensi sebagai antikanker baru dalam strategi pengembangan kemoterapi (20).

Tumbuhan, telah lama kita ketahui merupakan sumber yang sangat penting dalam upaya mempertahankan kesehatan masyarakat. Catatan dari badan kesehatan dunia (WHO), 80% penduduk dunia masih menggantungkan hidup sehat pada penggunaan obat tradisional yang berasal dari tumbuhan dan 25% dari obat-obat modern yang beredar di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan dari tumbuhan sampai saat ini.

Indonesia dikenal sebagai salah satu dari tujuh negara dengan keanekaragaman hayati terbesar, fakta ini tentu memiliki potensi dalam pengembangan obat herbal yang berbasis pada tumbuhan obat dalam usaha kemandirian di bidang kesehatan. Tumbuhan tersebut menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan struktur molekul dan aktivitas biologi yang beraneka ragam. Beberapa senyawa yang telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikanker, antara lain golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid, santon dan kumarin (20).

II.7 Hedgehog

Signal dalam proliferasi kanker *hedgehog (Hh)* mengatur berbagai kejadian dalam perkembangan embrio dan pemeliharaan jaringan otot

dewasa, Jika Hh rusak maka akan terjadi cacat lahir bawaan. Dan jika terjadi penyimpangan Hh mengakibatkan penyakit kanker (8,9).

Signal mula-mula mengikat ligan protein Hh pada membran reseptor *PTCH*. Ikatan ini akan menekan aktivitas *Proto-oncogen-Smoothened (SMO)* dan memicu pelepasan Gen GLI. Kelebihan GLI akan menyebabkan karsinoma, medula blasoma, kanker pankreas, kanker prostat. Sehingga GLI target protein digunakan sebagai obat penemuan anti kanker.(8,9)

Trend pengembangan inhibitor signal Hh sebagai anti kanker sejak ditemukan Hh antagonis dari bahan alam yakni *Cyclopamin*, pada beberapa jenis seperti karsinoma, medula blasoma. Signal Hh disebabkan oleh mutasi *PTCH* atau *SMO*, mutasi akan mengaktifkan GLI lalu GLI berpartisipasi pada langkah terakhir aktivasi kanker yang berkaitan dengan penyimpangan signal Hh.(8,9)

GLI yang merupakan faktor transkripsi menyerupai zink, berperan mengatur beberapa gelombang termasuk sel pembeda yang berhubungan dengan signal Hh. Ada tiga gen homolog GLI dalam vertebrata GL1, GL2, dan GL3. Aktivator gelombang GL1, target utama Hh menyebabkan hubungan langsung dengan pembentukan tumor pada wilayah promotor (5'-GACCACCCA-3') target gen. Sementara GL2 dan GL3 bertindak sebagai repressor (8,9).

II.8 Dynabeads

Magnetic beads (Dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid) ini bersifat sebagai magnet yang dapat menjerap senyawa-senyawa yang terimmobilisasi pada target protein GLI (11).

Buffer-buffer yang digunakan untuk pencucian dan pengaktifan dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid adalah MES (2- (N-morpholino) ethanesulfonic asam), GLI GST (Gluthatione Sepharose) (14), PBS (Phosphate Buffer Saline) dan Buffer Net N (Nonidet-P-40).

Dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid mengandung polistirene yang bersifat supermagnet, pada setiap pori-porinya terdapat partikel dengan kekuatan magnet yang sangat besar. Partikel-partikel tersebut disalut oleh lapisan hidrofilik glisidil eter.

Pengaktifan GLI-dynabeads harus dilakukan terlebih dahulu karena asam karboksilat yang dikandung oleh dynabeads bersifat labil dan sangat mudah terhidrolisis. Fungsi dari buffer dalam pengaktifan GLI-dynabeads antara lain :

- Buffer MES : melekatkan dan memudahkan pelekatan dynabeads dan rekombinan protein GLI
- Buffer PBS : untuk mencuci GLI-dynabeads dari zat-zat pengotor dan logam-logam yang bersifat spesifik.
- Buffer HCL : untuk mencegah aktivasi non reaktif dari asam karboksilat dynabeads.

- Buffer Net N : sebagai buffer penstabil, dapat digantikan dengan tween

20 atau triton X-100. Buffer ini juga menyebabkan GLI-dynabeds dapat disimpan beberapa bulan jika suhu penyimpanan berkisar pada 2-8°C

II.9 GLI-GST (*Gluthatione Sepharose Transferase*)

GST dikulturkan oleh H.Sasaki (Riken, Jepang) (14) dari bakteri *Escherichia coli*, menggunakan vektor pGEX. pGEX-KG (Guan dan Dixon, 1991) digunakan untuk sintesis GST. Pertama-tama kultur bakteri diinduksi dengan 0.1 mM IPTG (Isopropyl β -P-Thiogalactopyranoside). Setelah tiga jam induksi, dilakukan sentrifugasi dan sonifikasi pada kultur sambil menambahkan 10% Tween-20 sebanyak 12 gram selama 10 menit. Supernatan ditambahkan vektor pGEX untuk mensintesis kultur.

Rekombinan GLI dibuat dengan menambahkan protein HNF-3 β pada fusi GST. Plasmid pGEX-GLI lalu dikonstruksi dengan mengkloning HincII-XbaI pada cDNA dari GLI manusia pada sisi SmaI dan XbaI dari pGEX-KG. Konstruksi cloning ini menghasilkan GLI-GST.