

Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia rotunda L.*) dengan Metode Maserasi

Identification of Secondary Metabolite Compounds of Temu Kunci (Boesenbergia rotunda L.) Ethanol Extract using the Maceration Method

Siti Mutripah¹, Lailatul Badriyah²

¹ Akademi Farmasi Kusuma Husada Purwokerto, D3 Farmasi, Jl. Gerilya No.12, Windusara, Karangklesem, Kec. Banyumas, Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah, Indonesia 53144

² Akademi Farmasi Kusuma Husada Purwokerto, D3 Farmasi, Jl. Gerilya No.12, Windusara, Karangklesem, Kec. Banyumas, Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah, Indonesia 53144

*sitimutripah@gmail.com

ABSTRAK

Keanekaragaman hayati Indonesia yang sangat beragam memungkinkan banyak spesies tumbuhan untuk tumbuh dengan baik. Salah satu contoh tanaman yang mudah tumbuh di Indonesia adalah temu kunci (*Boesenbergia rotunda L.*). Temu kunci (*Boesenbergia rotunda L.*) merupakan golongan tempah-rempah asli Indonesia. Tanaman ini masih jarang dibudidayakan dan dimanfaatkan. Alasan temu kunci belum dimanfaatkan secara optimal oleh Masyarakat disebabkan kandungan metabolit sekunder pada temu kunci yang belum banyak diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan identifikasi metabolit sekunder pada temu kunci dengan menggunakan ekstrak etanol 96%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan etanol 96% dalam proses ekstraksi memperoleh hasil yang baik dengan diperolehnya rendemen ekstrak sebanyak 16,5%. Hasil identifikasi metabolit sekunder menunjukkan bahwa temu kunci memiliki kandungan senyawa flavonoid, terpenoid dan steroid. Ketiga senyawa ini merupakan senyawa yang potensial sebagai agen anti bakteri, anti fungi dan antioksidan.

Kata kunci: temu kunci, ekstrak etanol, metabolit sekunder

ABSTRACT

*Indonesia's very diverse biodiversity allows many plant species to grow well. One example of a plant that is easy to grow in Indonesia is curcuma (*Boesenbergia rotunda L.*). Temu Kunci (*Boesenbergia rotunda L.*) is a group of spices native to Indonesia. This plant is still rarely cultivated and used. The reason key curcuma have not been utilized optimally by the community is because the secondary metabolite content in key curcuma is not yet well known. This research aims to identify secondary metabolites in key crops using 96% ethanol extract. The research results showed that the use of 96% ethanol in the extraction process obtained good results with an extract yield of 16.5%. The results of secondary metabolite identification show that curcuma contains flavonoid, terpenoid and steroid compounds. These three compounds are potential compounds as anti-bacterial, anti-fungal and antioxidant agents.*

Keywords: ginger root, ethanol extract, secondary metabolites.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Kekayaan keanekaragaman hayati Indonesia didukung oleh iklim tropis yang dimiliki sehingga memungkinkan banyak makhluk hidup untuk mampu tumbuh dan berkembang biak dengan baik. Berdasarkan data dari LIPI tahun 2014, Indonesia memiliki keanekaragaman jenis flora sebanyak 15,5% dari jumlah total flora di Dunia dan keanekaragaman jenis fauna sebanyak 10% dari jumlah total fauna di Dunia (LIPI, 2014). Salah satu keanekaragaman flora di Indonesia yang menjadi perhatian dunia adalah rempah-rempah. Rempah-rempah dapat diklasifikasikan ke dalam tanaman fungsional. Maksud dari tanaman fungsional adalah tanaman yang dapat digunakan sebagai sumber gizi dan juga memiliki fungsi secara fisiologis di bidang kesehatan (Batubara dan Prasetya, 2020).

Salah satu tanaman rempah di Indonesia yang masih belum banyak dibudidayakan dan dimanfaatkan adalah temu kunci (*Boesenbergia rotunda L.*). Temu kunci termasuk ke dalam famili Zingiberaceae yang dapat tumbuh dengan baik di daerah Asia Tenggara dan Asia Selatan. Beberapa manfaat temu kunci adalah untuk penghasil minyak atsiri (Arniputri et al., 2007, Pratiwi dan utami, 2018), anti inflamasi (Akmalia et al., 2016), anti oksidan, anti kanker dan anti virus (Silalahi, 2017). Adanya manfaat yang beragam dari temu kunci merupakan suatu indikasi bahwa temu kunci memiliki metabolit sekunder yang potensial.

Metabolit sekunder adalah senyawa organik yang tidak terlibat langsung dalam menunjang kehidupan suatu organisme, namun senyawa ini berperan dalam kehidupan ekologis dan fungsional lainnya (Pagare et al., 2015). Menurut Thirumurugan et al. (2021), metabolit sekunder dapat ditemukan disemua jenis makhluk hidup baik hewan maupun tumbuhan, namun tanaman memiliki prosentase penghasil metabolit sekunder yang lebih besar, yaitu sekitar 80% dari total jenis metabolit sekunder. Total metabolit sekunder yang telah berhasil diidentifikasi adalah sejumlah 2.140.000. salah satu contoh metabolit sekunder yang sering dijumpai pada tanaman diantaranya berupa flavonoid, tannin, alkaloid, terpenoid dan steroid serta saponin (Mairin dan Ariantari, 2022).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder pada rimpang temu kunci (*Boesenbergia rotunda L.*) dengan melakukan uji metabolit sekunder secara kualitatif. Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi terhadap masyarakat akan adanya zat aktif pada temu kunci yang berkhasiat secara farmakologis, sehingga rimpang temu kunci dapat lebih dikenal dan dimanfaatkan.

METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan november 2023 di Laboratorium Kimia Farmasi Akademi Farmasi Kusuma Husada Purwokerto. Bahan yang digunakan pada penelitian ini berupa rimpang temu kunci (*Boesenbergia rotunda L.*), etanol 96%, bubuk Mg, FeCl₃ (Merck), CHCl₃ (Merck), NH₃(Merck), H₂SO₄(Merck), HCN, NaHCO₃ (Merck), NaNO₂ (Merck), AlCl₃ (Merck), NaOH (Merck), reagen dragendorf dan reagen Folin Coicalteu.

Pembuatan simplisia

Sampel rimpang temu kunci sebanyak 3 kg dibersihkan dan disortasi. Setelah diperoleh rimpang temu kunci yang sesuai kriteria, rimpang tersebut kemudian dikering anginkan untuk selanjutnya dilakukan penghalusan menggunakan blender.

Penghitungan kadar air

Penghitungan kadar air pada simplisia temu kunci dilakukan dengan cara menimbang berat sampel awal dan berat sampel setelah pengeringan dalam oven. Perhitungan kadar air ini penting dilakukan untuk mengetahui mutu suatu sampel. Tahapan analisis kadar air diwali dengan menimbang berat awal sampel temu kunci sebanyak 4 gram, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100-105°C selama 3 jam, didinginkan dalam desikator dan kemudian ditimbang kembali. Perhitungan kadar air menggunakan rumus metode oven (AOAC, 1984):

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{berat awal sampel}}{\text{berat sampel setelah pengeringan}}$$

Ekstraksi Maserasi

Proses ekstraksi diawali dengan menimbang 20 gram serbuk temu kunci, ditambahkan etanol 96% sebanyak 100 ml hingga sampel terendam, diaduk secara berkala selama 1x24 jam. Hasil ekstraksi dipisahkan dengan rendemen dengan cara disaring menggunakan kertas saring. Hasil ekstrak dipisahkan menggunakan evaporator, sedangkan hasil rendemen dihitung kadarnya (Najib, 2018). Perhitungan jumlah rendemen diperoleh dengan rumus:

$$\text{Kadar rendemen (\%)} = \frac{\text{berat rendemen}}{\text{berat sampel sebelum ekstraksi}}$$

Analisis Kualitatif Senyawa Flavanoid

Ekstrak sampel temu kunci ditambahkan dengan magnesium sebanyak 0.1 mg, amil alcohol sebanyak 0,4 ml dan 4 ml alkohol lalu dikocok. Jika larutan sampel terdapat flavonoid maka warna akan terlihat berwarna jingga-merah (Alabri et al. 2014, Badriyah et al. 2023).

Analisis Kualitatif Senyawa Tanin

Ekstrak sampel temu kunci sebanyak 1 gram dididihkan dalam 10 ml akuades. Setelah mendidih kemudian ekstrak didinginkan dan ditambahkan dengan 5 ml FeCl₃ 1 %. Ekstrak dinyatakan mengandung tannin jika larutan menjadi warna hitam atau biru ke hijauan (Iqbal et al., 2015, Badriyah et al., 2023).

Analisis Kualitatif Senyawa Alkaloid

Ekstrak sampel temu kunci sebanyak 0,1 gram dimasukan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 10 ml CHCl₃ dan beberapa tetes amonia. Fraksi CHCl₃ ini diambil kemudian ditetesi dengan H₂SO₄ pekat sebanyak 2-3 tetes serta direaksikan dengan pereaksi Dragendorf, mayer dan wagner. Jika hasil larutan yang direaksikan menghasilkan endapan merah jingga, maka larutan mengandung alkaloid (Iqbal et al. 2015; Khanifah et al. 2020 dan Badriyah et al. 2023).

Analisis Kualitatif Senyawa Terpenoid dan Steroid

Ekstrak sampel temu kunci sebanyak 1 gram ditambahkan 3 tetes anhidrida asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya senyawa golongan terpenoid akan ditandai dengan timbulnya warna merah sedangkan golongan steroid ditandai munculnya warna biru (Fransiska et al., 2021).

Analisis Kualitatif Senyawa Saponin

Ekstrak sampel temu kunci sebanyak 1 gram ditambahkan dengan air panas secukupnya dan ditetes HCN sebanyak 1 tetes, kemudian dihomogenkan. Jika setalah dihomogenkan larutan sampel menimbulkan buih atau gelembung menandakan jika sampel positif mengandung saponin. (Banso & Adeyemo, 2006; Badriyah et al. 2023).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Temu kunci (*Boesenbergia rotunda L.*) merupakan tanaman yang memiliki manfaat besar dan mudah tumbuh di Indonesia, namun pemanfaatan dan budidaya temu kunci masih sangat terbatas. Temu kunci yang dijadikan bahan penelitian adalah temu kunci yang diperoleh dari pekarangan warga di Daerah Purwokerto, Jawa Tengah. Berdasarkan hasil uji kadar air sampel temu kunci, diperoleh hasil kadar air yang terkandung dalam temu kunci sebesar 8%. Perhitungan kadar air ini diperlukan untuk mengetahui kualitas suatu simplisia dalam pembuatan bahan obat tradisional (Depkes RI, 2000., Veninda el al, 2023)

Setelah sampel temu kunci diperoleh, kemudian sampel tersebut di ekstrak dengan menggunakan metode maserasi selama 1x24 jam menggunakan etanol 96%. Etanol 96% ini digunakan didasarkan pada penelitian (Permatasari et al 2020) yang membandingkan maserasi dengan berbagai konsentrasi etanol dan konsentrasi etanol yang paling tinggi memiliki hasil metabolit sekunder yang paling baik. Berdasarkan hasil ekstraksi menggunakan etanol 96% diperoleh berat rendemen sebesar 16,5%. Perhitungan hasil rendemen ini perlu untuk mengetahui banyaknya hasil ekstrak yang diperoleh dalam proses ekstraksi (Hasnaeni et. al., 2019). Menurut Harbone (1987), semakin tinggi rendemen yang diperoleh, maka semakin tinggi pula zat aktif yang diperoleh dari hasil suatu ekstraksi.

Tabel 1. Hasil identifikasi metabolit sekunder

No.	Uji	Warna yang terbentuk	Hasil
1.	Flavonoid	Merah	+
2.	Tannin	Coklat	-
3.	Alkaloid (pereaksi wagner)	Coklat muda kehitaman	-
4.	Alkaloid (pereaksi mayer)	Coklat muda mengendap	-
5.	Alkaloid (pereaksi dragendorf)	Coklat kehitaman	-
6.	Terpenoid	Merah	+
7.	Saponin	Muncul buih	+

Berdasarkan hasil uji metabolit sekunder ekstrak temu kunci diperoleh hasil jika temu kunci memiliki kandungan flavonoid, terpenoid dan steroid. Pada uji flavonoid, sampel pada ekstrak temu kunci berubah menjadi warna merah sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak temu kunci positif memiliki kandungan flavonoid. Flavonoid adalah suatu senyawa turunan dari 2-fenilbenzopiren yang mengandung 3 cincin. Flavonoid adalah kelompok terbesar senyawa fenolik (Hanin dan Pratiwi, 2017) . Jenis flavonoid biasanya terdapat di semua tumbuhan namun. Jenis flavonoid pada setiap tumbuhan memiliki ciri khas masing-masing. Beberapa contoh jenis flavonoid yang berhasil diidentifikasi ada pada tanaman adalah misalnya flavonol, flavon, flavonon, flavononol, isoflavon, antosianidin dan proantosianidin (Indrawati & Razimin, 2013).

Flavonoid pada tumbuhan terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk rimpang (Neldawati et al., 2013). Flavonoid diketahui memiliki efektivitas sebagai antioksidan atau penangkal radikal bebas. Senyawa ini digunakan oleh tanaman untuk mempertahankan diri dari penyakit. Pada manusia antioksidan ini bermanfaat sebagai pencegah terjadinya penumpukan lemak yang menjadi pemicu obesitas dan diabetes miltius (Anwar, et al., 2017), serta mampu mengurangi resiko penyakit jantung dan kanker (Ukoha et al., 2011).

Hasil uji metabolit sekunder yang ke dua dari temu kunci adalah terpenoid. Terpenoid adalah penyusun minyak atsiri pada tumbuhan. Oleh karena itu senyawa terpenoid banyak di jumpai di tumbuhan jenis rempah-rempah. Sebagai bumbu masakan, wewangian ataupun bahan pengobatan (Mierza et al 2023). Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan perubahan warna pada ekstrak temu kunci menjadi berwana merah. Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan banyak di jumpai pada sitoplasma tumbuhan yang memberikan aroma, rasa dan warna yang khas. Senyawa ini juga dapat berfungsi sebagai antioksidan yang bermanfaat sebagai penangkal radikal bebas (Masyita, 2022).

Hasil uji metabolit sekunder selanjutnya yang dinyatakan positif pada ekstrak temu kunci adalah saponin. Ekstrak temu kunci dinyatakan positif mengandung saponin dengan munculnya buih/busa stabil dengan ketinggian 1-3 cm selama 30 menit (Suharto et al., 2014). Saponin adalah golongan senyawa yang memiliki efektivitas sebagai anti mikroba/anti bakteri, anti fungi dan anti peradangan (Arif et al., 2008).

Dalam percobaan selain diperoleh hasil senyawa positif juga diperoleh hasil senyawa yang negative, diantaranya adalah senyawa tanin dan senyawa alkaloid. Berdasarkan percobaan diatas dalam uji senyawa tanin diperoleh hasil negative dengan ditemukannya warna coklat pada perubahan warna ekstrak uji. Menurut Jati, et al. (2019) suatu simplisia dinyatakan positif tanin jika dalam pengujian fitokimia terjadi perubahan warna ekstrak menjadi biru tua atau hitam kehijauan. Selain tanin, uji alkaloid pada pengujian ekstrak etanol temu kunci juga dinyatakan negative. Pengujian alkaloid pada ekstrak etanol temu kunci dilakukan dengan menggunakan tiga pereaksi, yaitu pereaksi dragendorf, mayer dan wagner. Menurut Oktavia dan Sutoyo (2021), uji alkaloid dinyatakan positif jika terjadi endapan dan perubahan warna sampel menjadi putih pada pereaksi mayer, terjadi endapan dan perubahan warna sampel menjadi coklat pada pereaksi wagner dan terjadi endapan serta perubahan warna menjadi jingga pada pereaksi dragendorf.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil percobaan di atas dapat disimpulkan jika temu kunci memiliki metabolit sekunder berupa senyawa flavonoid, terpenoid dan steroid. Adanya ketiga senyawa tersebut diketahui memiliki manfaat yang besar dalam pengobatan. Saran yang dapat disampaikan dari hasil percobaan adalah diperlukan uji lanjut temu kunci sebagai bahan aktif dalam uji antibakteri, uji antifungi dan uji antioksidan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Akademi Farmasi Kusuma Husada Purwokerto dan Yayasan Dharmais yang telah memberikan kesempatan dan pendanaan kepada kami untuk mengembangkan diri dan melaksanakan tri darma perguruan tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adilla , R. A., Hajrah, & Rijai, L. (2016). Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Rimpang Temu Kunci. Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian Ke-4,. Samarinda.
- Anwar F, Latif S, Ashraf M, & Gilani AH. 2007. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res.*, 21: 17–25.
- Arif, A., Sri, W., Weandarlina, I. Y., 2008, Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Saponin Ekstrak Metanol Daun, E-jurnal 3–8.
- Arniputri, R.B., A.T. Sakya., M. Rahayu. 2007. Identifikasi Komponen Utama Minyak Atsiri Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) pada Ketinggian Tempat yang Berbeda. *Biodiversitas*. 8(2): 135-137.
- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC).(1984). Method of Analysis.Washington,D.C
- Hanin, N. N., & Pratiwi, R. (2017). Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Paku Laut (*Acrostichum aureum* L.) Fertil dan Steril. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 51—56.
- Badriyah, L., Ifandi, S., & Alfiza, I. S. (2023). Analisis Kualitatif Fitokimia pada Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* L.) sebagai antibakteri *Klebsiella Pneumonia*. *HERCLIPS (Journal of Herbal, Clinical and Pharmaceutical Sciences)*, 2715-0518.
- Banso, A and Adeyemo, S.O (2006). Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abutilion mauritianum*, *Bacopa monnifera* and *Datura stramonium*. *Biokemistry* 18(1):39-44
- Batubara, I., & prasetya, m. e. (2020). Potensi Tanaman Rempah dan Obat Tradisional Indonesia Sebagai Sumber Bahan Pangan Fungsional. Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal ke-8 .
- Departemen Kesehatan RI. Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat. Dep Kesehat RI. 2000;1:10-11
- Elizabeth A. Widjaja, Y. R., & elizabeth, A. (2015). Kekinian keanekaragaman hayati Indonesia, 2014. LIPI.
- Fransiska, A. N., Masyrofah, D., Marlian, H., Sakina, I. V., & Tyasna, P. S. (2021). Identifikasi Senyawa Terpenoid Dan Steroid Pada Beberapa Tanaman Menggunakan Pelarut N-Heksan. *Jurnal Health Sains*, 2723-4339.
- Harborne, J. B. (1987). Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. (Edisi II). Bandung: Penerbit ITB.
- Hasnaeni, Wisdawati, & Usman, S. (2019). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Dan Kadar Fenolik Ekstrak Tanaman Kayu Beta-Beta (*Lunasia amara Blanco*). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)*, 175 - 182.
- Indrawati, N. L., Farm, S., & Razimin, S. S. 2013, Bawang Dayak: Si Umbi Ajaib Penakluk Aneka Penyakit, AgroMedia, Jakarta
- Iqbal, E., Salim, K. A., & Lim, L. B. L. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw)

from Brunei Darussalam. Journal of King Saud University - Science, 27(3), 224–232.
Doi:10.1016/j.jksus.2015.02.003.

Jati, N. K., Prasetya, A. T., & Mursiti, S. (2019). Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Alkaloid pada Daun Pepaya. Jurnal MIPA 42 (1) (2019): 1-6.

Mairing, P. P., & Putu , N. A. (2022). Review: Metabolit Sekunder dan Aktivitas Farmakologi Tanaman Mangrove (*Sonneratia alba*). JURNAL FARMASI UDAYANA, 2622-4607.

Masyita, A., Sari, R. M., Astuti, A. D., Yasir, B., Rumata, N. R., Emran, T. B., . . . Gandara, J. S. (2022). Terpenes And Terpenoids As Main Bioactive Compounds Of Essential Oils, Their Roles In Human Health And Potential Application As Natural Food Presentatives. Food Chemistry: X.

Mierza, V., S, a., ichsani, A., Dwi , N., A, S., & Dwi, S. (2023). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid. Jurnal Surya Medika.

Najib, A. (2019). Ekstraksi Senyawa Bahan Alam. Yogyakarta: DEEPUBLISH.

Neldawati, Ratnawulan, & Gusnedi, 2013, Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat, Pillar of Physics 2, 76-83.

Oktavia, F. D., & Sutoyo, S. (2021). Skrining Fitokimia, Kandungan Flavonoid Total, Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Tumbuhan *Selaginella Doederleinii*. Jurnal Kimia Riset, Volume 6 No. 2, 141-153.

Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Y.K. , B. (Vol. 9 (3) 293-304 July 2015, ISSN 0973-8916). Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2230-7303.

Permatasari, A., Batubara, I., & Nursid, M. (2020). Pengaruh konsentrasi etanol dan waktu maserasi terhadap rendemen, kadar total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut *Padina australis*. Majalah Ilmiah Biologi Biosfera: A Scientific Journal, 37(2), 78–84. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2020.37.2.1> 192

Pratiwi, a., & Utami, L. B. (2018). Isolasi dan Analisis Kandungan Minyak Atsiri pada Kembang Leson. Bioeksperimen, Volume 4 No.1.

R. Veninda, H., M. Belinda, A., Muhammin, & Febriyanti, R. (2023). Simplicia Characterization and Phytochemical Screening of Secondary Metabolite Compounds of Bebuas Leaves (*Premna serratifolia* L.). Indonesian Journal of Biological Pharmacy, 63-73.

Silalahi, M. (2017). *Boesenbergia rotunda* (L.). Mansfeld: Manfaat dan Metabolit Sekundernya. Jurnal EduMatSains, 1 (2), 107-118.

Thirumurugan, V., Prabakaran, N., Nair, V. S., & Ramesh, C. (2021). Ecological importance of two large heritage trees in Moyar River valley, southern India. Journal of Threatened Taxa, 17587–17591.

Ukoha PO, Cemaluk EAC, Nnamdi OL, Madus EP. 2011. Tannins and other phytochemicals of the Samanea saman pods and their antimicrobial activities. African Journal of Pure and Applied Chemistry. 5, 237-244.