BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli*

Menurut (Smith-Keary, 1988; Jawetz *et al.*, 1995), *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif. *Escherichia coli* terdapat pada usus makhluk hidup yang berperan penting untuk sintesis vitamin K, mengubah pigmen empedu, dan menyerap sari-sari makanan (Ganiswarna, 1995). Namun *Escherichia coli* rentan menjadi bakteri patogen yang dapat menyebabkan diare hingga pendarahan yang serius pada makhluk hidup (Alexandru *et al.*, 2014).

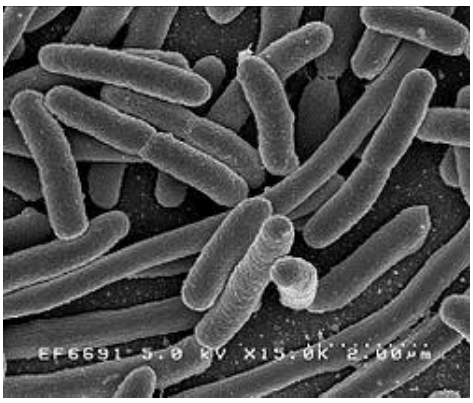
Post (2005) menyatakan bahwa klasifikasi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: *Escherichia*
Spesies	: *Escherichia coli*

2.1.1 Karakteristik *Escherichia coli*

Menurut Alexandru *et al.* (2014), ciri – ciri dari *Escherichia coli* (Gambar 1) adalah sebagai berikut:

a. Merupakan kelompok bakteri gram negatif.
b. Merupakan bakteri berbentuk batang.
c. Tersebar di banyak tempat dan kondisi, bakteri ini tahan terhadap suhu, bahkan pada suhu ekstrim sekalipun.
d. Suhu yang baik untuk pertumbuhan bakteri ini adalah antara 8°C - 46°C, tetapi suhu optimumnya adalah 37°C.



Gambar 1. *Escherichia coli*
Sumber: Alexandru *et al*, 2014.

2.1.2. Siklus hidup *Escherichia coli*

Menurut Alexandru *et al.* (2014), siklus hidup *Escherichia coli* (Gambar 2) sebagai berikut :

a. Fase Penyesuaian (Fase Lack/adaptasi).

Pada fase ini yaitu 1 sampai 2 jam setelah pemindahan, bakteri belum mengadakan pembiakan, belum terjadi pembelahan sel karena enzim belum disintesa dan pertumbuhan tidak nyata. Bakteri-bakteri yang hidup pada fase ini akan mulai membesar. Lamanya fase penyesuaian dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu :

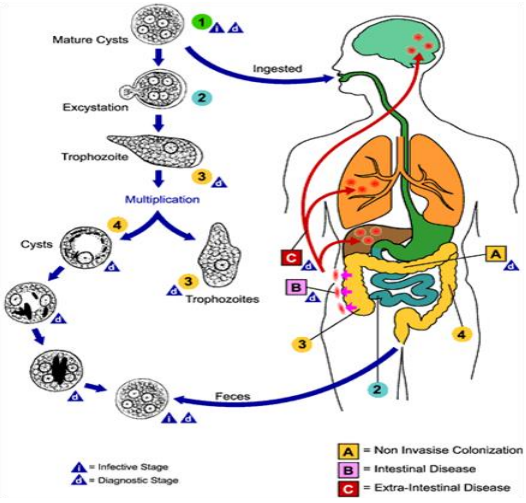
i. Media dan lingkungan pertumbuhan sel.
ii. Jumlah Inokulum (Penanaman bakteri).

b. Fase Logaritmik.

Sesudah menyesuaikan diri dengan lingkungan baru, bakteri mulai bertambah sedikit demi sedikit dan sel-sel mulai gemuk. Pada fase ini bakteri membelah cepat dan konstan dimana pertumbuhan jumlahnya mengikuti kurva logaritmik, yaitu pertumbuhan yang sangat cepat. Pada fase ini pertumbuhan sangat cepat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya, seperti pH, kandungan nutrien, kondisi lingkungannya, suhu, dan kelembapan udara. Pembelahan berlangsung terus sampai terjadi pertumbuhan hasil-hasil metabolisme yang bersifat racun dan menyebabkan pertumbuhan melambat.

c. Fase Kematian

Pada fase ini, bakteri mengalami kematian karena nutrisi dan cadangan energi di dalam sel bakteri habis.



Gambar 2. Siklus hidup *Escherichia coli*
Sumber: WHO, 2010.

Menurut Krisnaningsih *et al.* (2005) bahwa bakteri dapat beradaptasi terhadap antibotik dan menghasilkan enzim yang berfungsi sebagai sistem kekebalan tubuhnya untuk dapat membuat dirinya menjadi resisten terhadap antibiotik. WHO (2014) menyatakan terdapat ribuan jenis bakteri *Escherichia coli* yang telah diteliti. Tetapi dengan perkembangan revolusi gen yang terjadi pada tubuh bakteri, obat anti bakteri yang telah ditemukan menjadi resisten terhadap bakteri tersebut.

2.2 Sponge

2.2.1 Deskripsi Sponge

Sponge merupakan hewan dari filum porifera berpori yang hidup di laut mulai dari daerah perairan pantai yang dangkal hingga kedalaman 5500 meter, hidupnya selalu melekat pada substrat dan tidak dapat berpindah tempat secara bebas (Soest, 1986).

Menurut Suparno (2005), bahwa struktur sponge asimetri atau simetri (Gambar 3). Tempat terjadinya sirkulasi air selama proses pencarian bahan makanan terjadi di rongga, dan tidak memiliki jaringan atau organ tubuh.

Gambar 3. Sponge Perairan Sabang

Setiap sponge tidak selalu memiliki kandungan metabolit sekunder yang sama dengan sponge lainnya. Proses terjadinya pembentukan metabolit sekunder di dalam struktur sponge sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungannya (Bregman and Feeney, 1990).

2.2.2 Habitat sponge

Menurut Becerro *et al.* (2003), habitat sponge dimulai pada kedalaman 2 meter sampai 3000 meter. Perbedaan kedalaman sponge dapat mengakibatkan perbedaan struktur dan komposisi dari sponge tersebut. Hal ini disebabkan karena perbedaan intensitas cahaya, densitas dan tingkat adaptasi terhadap lingkungan sekitar (Pawlik, 1999; Burns *et al*, 2003).

2.2.3 Siklus Hidup Sponge

Menurut Edwards (2010), perkembangbiakan Porifera dapat dilakukan secara vegetatif dan generative (Gambar 4). Perkembangbiakan secara vegetatif dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu :

1. Pembentukan tunas.

Tunas yang terbentuk memisahkan diri dari induknya kemudian terbentuk individu baru.

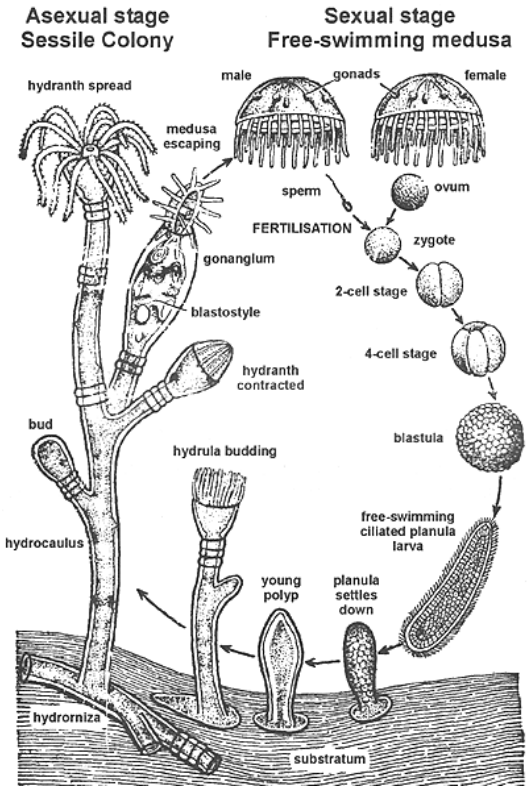
2. Gemmulae (butir benih).

Gemmulae adalah sejumlah sel mesenkim yang berkelompok dan berbentuk seperti bola yang dilapisi kitin serta diperkuat spikula. Gemmulae terbentuk jika keadaan lingkungan sedang tidak menguntungkan atau menjelang musim dingin di dalam tubuh Porifera yang hidup di air tawar (Famili Spongilidae). Ketika keadaan lingkungan membaik, gemmulae akan terbentuk menjadi individu baru. Gemmulae hanya dimiliki oleh porifera air tawar. Proses pembentukan gemmulae adalah sebagai berikut :

- Arkeost mengumpulkan nutrient dengan memfagosit sel lain untuk dikumpulkan dalam rongga tubuh.
- Sel tertentu kemudian mengelilingi secret kumpulan tersebut dan membungkusnya. Terbentuklah kumpulan/cluster dan kapsul yang mengelilingi. Pada kondisi yang tepat gemmulae menetas dan sel-sel di dalamnya keluar dan berdiferensiasi membentuk spons baru.

Sedangkan perkembangbiakan generatif berlangsung secara anisogami, yaitu dengan peleburan gamet jantan (mikrogamet) dengan gamet betina

(makrogamet). Dari peleburan ini dihasilkan zigot yang kemudian berkembang menjadi larva bersilia.



Gambar 4. Siklus Hidup Sponge
Sumber : Edwards, 2010.

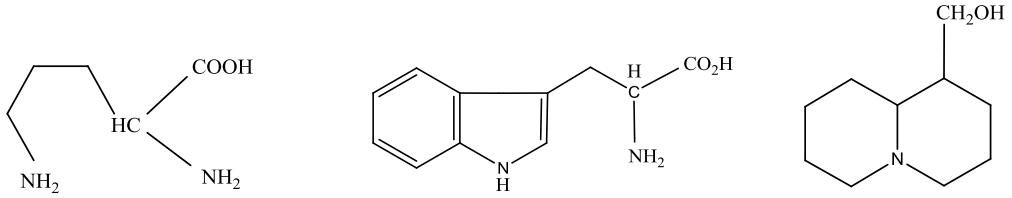
2.3 Senyawa metabolit sekunder pada sponge

Pada umumnya senyawa metabolik sekunder yang telah berhasil diisolasi mempunyai sifat bioaktivitas terhadap suatu sel dan mikroorganisme. Sifat biologis dari suatu senyawa dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme. Senyawa metabolik sekunder yang telah diisolasi pada umumnya berasal dari golongan alkaloid, terpenoid dan steroid (Bhakuni and Rawat, 2005). Pawlik (1999) menyatakan bahwa setiap sponge memiliki keragaman jenis berdasarkan perbedaan kedalaman, densitas, intensitas cahaya dan kondisi lingkungan sekitar.

Keragaman jenis sponge dipengaruhi oleh keragaman struktur kimia yang dikandung (Bregman and Fenney, 1990), sehingga setiap sponge memiliki peluang untuk menghasilkan obat anti bakteri resisten.

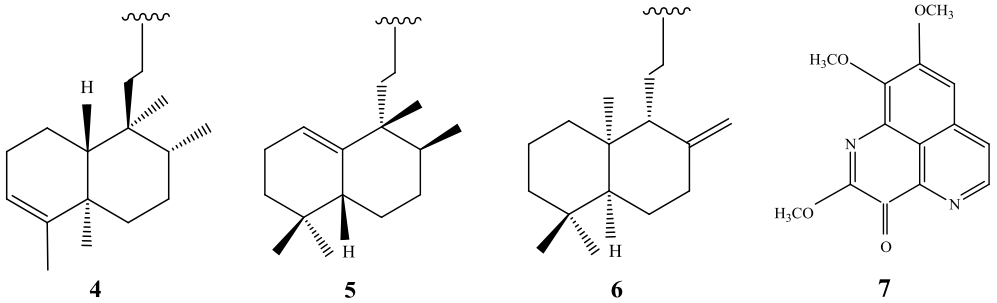
2.3.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang bersifat basa dan sebagian besar atom nitrogennya merupakan bagian dari cincin heterosiklik seperti **(1)** ornitin, **(2)** triptofan dan **(3)** lupinin (Gambar 5). Senyawa alkaloid yang terdapat di alam hampir semua mempunyai bioaktivitas antibakteri (Gotsbacher and Karuso, 2015).



Gambar 5. Beberapa senyawa alkaloid
Sumber : Gotsbacher and Karuso., 2015

Senyawa alkaloid yang berasal dari sponge telah berhasil diisolasi dan menunjukkan aktivitas yang kuat sebagai antibakteri telah dilaporkan oleh peneliti terdahulu (Gambar 6), antara lain **(4)** agelasina B, **(5)** agelasina C, **(6)** agelasina D yang dilaporkan oleh Arai *et al*. (2013), dan **(7)** 2-metoksi-3-oksoaaptamina yang dilaporkan oleh Arai *et al*. (2014).

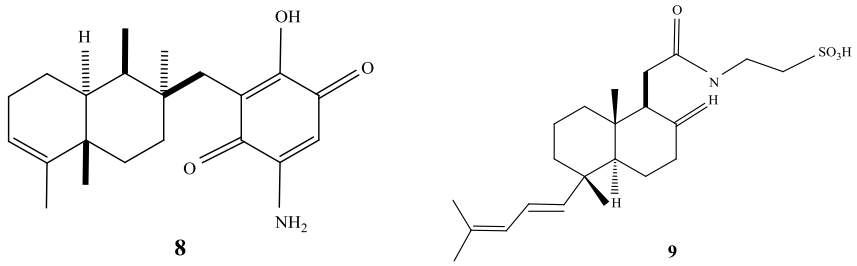


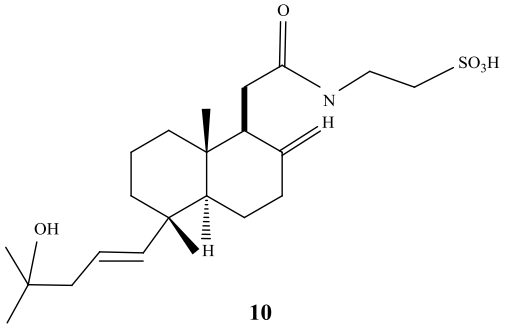
Gambar 6. Beberapa senyawa alkaloid yang berasal dari sponge memiliki aktivitas anti bakteri, **(4)** agelasina B, **(5)** agelasina C, **(6)** agelasina D, **(7)** 2-metoksi-3-oksoaaptamina.

2.3.2 Terpenoid

Terpenoid merupakan metabolik sekunder yang berasal dari golongan hidrokarbon yang terbentuk dari dua atau tiga beberapa unit isoprena (C_5) yang tergabung kedalam model kepala – ekor (head – to – tail) (Silverstein *et al*., 2005).

Telah banyak kelompok senyawa terpenoid yang berasal dari sponge diisolasi dan menunjukkan aktivitas sebagai antibakteri (Gambar 7), antara lain **(8)** dysideamine yang dilaporkan oleh Suna *et al*. (2009), dan **(9)** klatrimida A, **(10)** klatrimida B yang dilaporkan oleh Gupta *et al*. (2012).



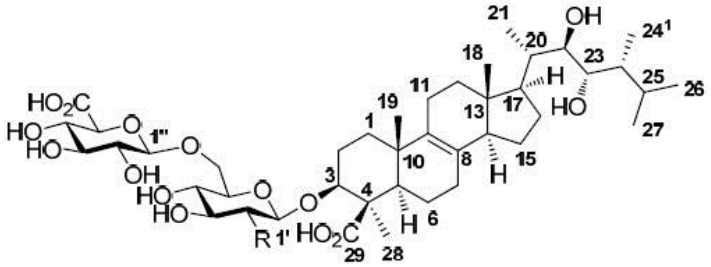


Gambar 7. Beberapa senyawa terpenoid yang berasal dari sponge memiliki aktivitas anti bakteri, **(8)** disideamina, **(9)** klatrimida A, dan **(10)** klatrimida B.

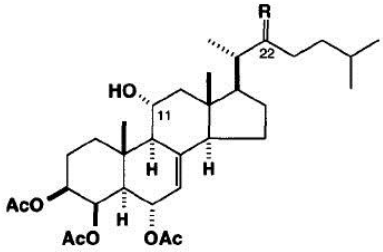
2.3.3 Steroid

Steroid merupakan senyawa yang mempunyai kerangka dasar karbon yang merupakan turunan hidrokarbon 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Steroid diklasifikasi berdasarkan sifat fisiologis yang terdiri dari sterol, asam empedu, aglikon kardiak dan sapogenin. Sedangkan dari sifat kimia dibedakan oleh jenis substituen yang terikat pada atom karbon C-10, C13, dan C-17 pada kerangka dasar karbon (Silverstein et *al*., 2005).

Senyawa steroid yang berasal dari sponge telah berhasil diisolasi dan menunjukkan sifat aktivitas sebagai anti bakteri, antara lain (Gambar 8), **(11)** ulososida F, **(12)** ulososida A yang telah dilaporkan oleh Colorado *et al*. (2013), dan **(13)** agosterol A yang dilaporkan oleh Aoki *et al*. (1998).



11 R = NHAc
12 R = OH



13

Gambar 8. Beberapa senyawa steroid yang berasal dari sponge memiliki aktivitas anti bakteri, **(11)** ulososida F, **(12)** ulososida A dan **(13)** agosterol A.

2.4 Isolasi Senyawa Bioaktif

Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen atau senyawa aktif pada suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Prinsip ekstraksi didasarkan pada distribusi senyawa yang terlarut (Khopkar, 2002). Menurut Steve and Russell (2008) bahwa metode ekstraksi yang umum digunakan maserasi, sokletasi, refluks, dan ekstraksi cair – cair (partisi). Metode ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini merupakan metode ekstraksi maserasi.

2.4.1 Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Metode ekstraksi ini sangat menguntungkan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena struktur senyawa dari suatu sampel tidak mudah rusak. Prinsip metode maserasi didasarkan bahwa sampel yang direndam dengan menggunakan pelarut organik akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat dari perbedaan tekanan yang terdapat di luar dan di dalam sel sehingga metabolit sekunder yang terkandung di dalam sitoplasma akan terlarut kedalam pelarut organik (Yeon-Ju *et al*., 2014).

2.4.2 Partisi

Partisi (ekstraksi cair-cair) merupakan metode pemisahan berdasarkan sifat kelarutan komponen target dan distribusinya di dalam dua pelarut yang saling tidak bercampur. Senyawa yang bersifat polar akan tertarik ke pelarut polar, senyawa semipolar akan tertarik ke pelarut semipolar dan senyawa nonpolar akan tertarik ke pelarut nonpolar (Khopkar, 2002).

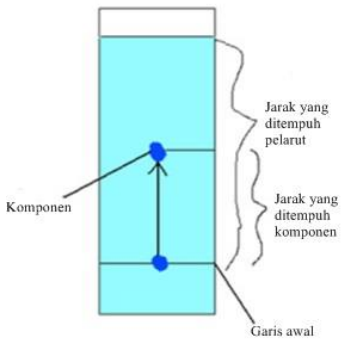
Pemisahan senyawa yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar dapat dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah. Pengocokan bertujuan untuk memperluas area permukaan kontak antara pelarut yang tidak bercampur. Syarat pelarut untuk metode partisi adalah memiliki kepolaran yang sesuai dengan bahan yang diekstrak dan harus terpisah setelah pengocokan (Harvey, 2000).

2.5 Kromatografi

Menurut Hostettmann *et al*. (1995) bahwa kromatografi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan suatu komponen dari suatu campuran senyawa. Secara umum ada tiga jenis kromatografi berdasarkan perbedaan fasa diam dan fasa gerak, yaitu kromatografi padat – cair (kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom), kromatografi cair – cair dan kromatografi gas – cair. Dalam penelitian ini, metode kromatografi yang digunakan adalah kromatografi padat – cair (kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom).

2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah salah satu metode pemisahan komponen dalam sampel berdasarkan perbedaan distribusi diantara fasa diam dan fasa gerak (Gambar 9). Fasa diam berupa plat dengan lapisan bahan adsorben dan fasa gerak umumnya bersifat cair (larutan). Fasa diam pada KLT antara lain silika gel, aluminium oksida (alumina) maupun selulosa (Harborne, 1984).



Gambar 9. Kromatografi Lapis Tipis
Sumber : Hardiananto, 2010.

Harborne (1984) menyatakan jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibandingkan dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal didefinisikan sebagai nilai R_f. Secara matematis dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh komponen}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

Menurut Sarker *et al*. (2006), ada dua faktor yang mempengaruhi nilai R_f pada kromatografi lapis tipis, yaitu penjerap dan pelarut yang diaplikasikan. Pada kromatografi jerapan dimana penjerapnya adalah silika gel, senyawa kutub akan memiliki afinitas besar terhadap penjerap, dan bermigrasi lambat ke atas tidak seperti halnya pelarut.

Tabel 1. Indeks Polaritas Pelarut

Polaritas	Rumus	Kelompok	Pelarut
Non Polar	R-H	Alkena	Petroleum, eters, hexane
↓	Ar – H	Aromatik	Toluene
	R – O – R	Eter	Dietil eter
	R – X	Alkil halide	Trikolorometane, chloroform
	R – COOR	Ester	Etil asetat
	R – CO – R	Aldehida dan keton	Aseton, MEK
	R – NH2	Amina	Piridin, trietilamina
	R – OH	Alkohol	MeOH, EtOH, IPA, butanol
	R – COHN2	Amida	Dimetilformamida
Polar	R – COOH	Asam karboksilat	Asam etanoat
	H – O – H	Air	

Sumber: Sadek, 2002.

2.5.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah salah satu metode yang digunakan untuk pemurnian senyawa dari campuran dengan memakai kolom (Gambar 10) (Steve and Russell, 2008). Fase gerak berupa larutan yang pilih berdasarkan hasil uji kromatografi lapis tipis dan fase diam berupa adsorben padat seperti silika gel atau alumina (Nicholas and Christopher, 1976; Silverstein et al., 2005).

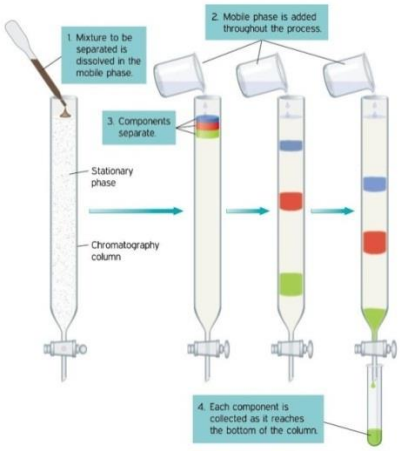
Menurut Gritter (1985) bahwa berdasarkan kepolaran fasa diam dan fasa gerak, kromatografi kolom dapat dibedakan menjadi 2 tipe, yaitu :

a. Kromatografi kolom fasa normal (*Normal phase*)

   Pada kromatografi ini, fasa diam yang digunakan bersifat polar sedangkan fasa gerak bersifat non polar, sehingga komponen yang memiliki kepolaran paling rendah akan terelusi lebih dulu.

b. Kromatografi kolom fasa terbalik (*Reversed phase*)

   Pada kromatografi ini, fasa diam yang digunakan bersifat non polar sedangkan fasa gerak bersifat polar, sehingga komponen yang memiliki kepolaran paling tinggi akan terelusi lebih dulu.



Gambar 10. Kromatografi kolom
Sumber: Pedrali *et al.*, 2014.

2.6 *Infrared Resonance* (IR)

Pasquini (2003) menyatakan bahwa spektroskopi inframerah (IR) hanya bekerja pada bilangan gelombang 4000-625 cm^{-1} atau ada panjang gelombang 1,6 - 2,5 μ. Pada daerah tersebut, masing-masing gugus fungsi senyawa organik akan mempunyai serapan yang sangat khas.

Silverstein *et al*. (2005) menyatakan bahwa frekuensi serapan pada bilangan gelombang IR dapat ditentukan dengan menggunakan hukum Hooke. Hukum Hooke menyatakan frekuensi vibrasi merupakan hubungan antara frekuensi, massa atom dan gaya konstant pada suatu ikatan. Gaya konstan dari beberapa tipe ikatan ditunjukkan pada tabel (2) dibawah ini dan secara matematis hukum Hooke dinyatakan sebagai berikut :

$$\bar{v} = \frac{1}{2\pi c}\sqrt{\frac{f}{(MxMy)(Mx+My)}}$$

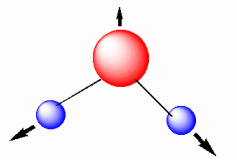
dimana : $\bar{v}$ = frekuensi vibrasi (cm^{-1})
c = kecepatan cahaya (cm/s)
f = gaya konstan suatu ikatan (dyne/cm)
Mx dan *My* = massa (g) atom x dan atom y

Tabel 2. Pengaruh tipe ikatan terhadap gaya konstan dan daerah serapan.

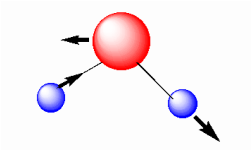
Tipe ikatan	Gaya konstan	Daerah serapan (cm^{-1})	
		Perhitungan	Teramati
C – O	5.0×10^5	1113	1300 – 800
C – C	4.5×10^5	1128	1300 – 800
C – N	4.9×10^5	1135	1250 – 1000
C = C	9.7×10^5	1657	1900 – 1500
C = O	12.1×10^5	1731	1850 – 1600
C ≡ C	15.6×10^5	2101	2150 – 2100
C – H	5.0×10^5	3032	3000 – 2850
O – H	7.0×10^5	3553	3800 – 2700

Sumber : Silverstein *et al*., 2005.

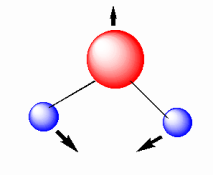
Silverstein *et al*. (2005) dan Pasquini (2003) menyatakan bahwa pola vibrasi molekul antar molekul pada H_2O, CO_2, dan CH_2 menghasilkan beberapa vibrasi spesifik, yaitu **(14)** vibrasi *stretching* simetris, **(15)** vibrasi *stretching* asimetris dan **(16)** vibrasi *scissoring* (*bending*) pada molekul H_2O. Pada molekul CO_2 menghasilkan **(17)** vibrasi *stretching* simetris, **(18)** vibrasi *stretching* asimetris, dan **(19)** dua bentuk vibrasi *scissoring* (*bending*). Pada molekul CH_2 menghasilkan **(20)** vibrasi *stretching* simetris, **(21)** vibrasi *stretching* asimetris, **(22)** vibrasi dalam bidang *bending* atau *scissoring*, **(23)** vibrasi dalam bidang *bending* atau *rocking*, **(24)** vibrasi luar bidang atau *wagging* dan **(25)** vibrasi luar bidang atau *twisting* (Gambar 11).



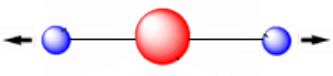
14



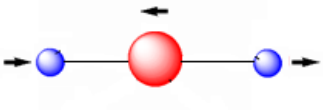
15



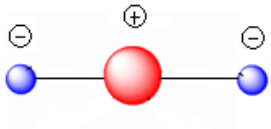
16



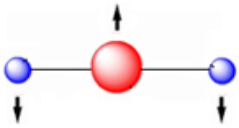
17



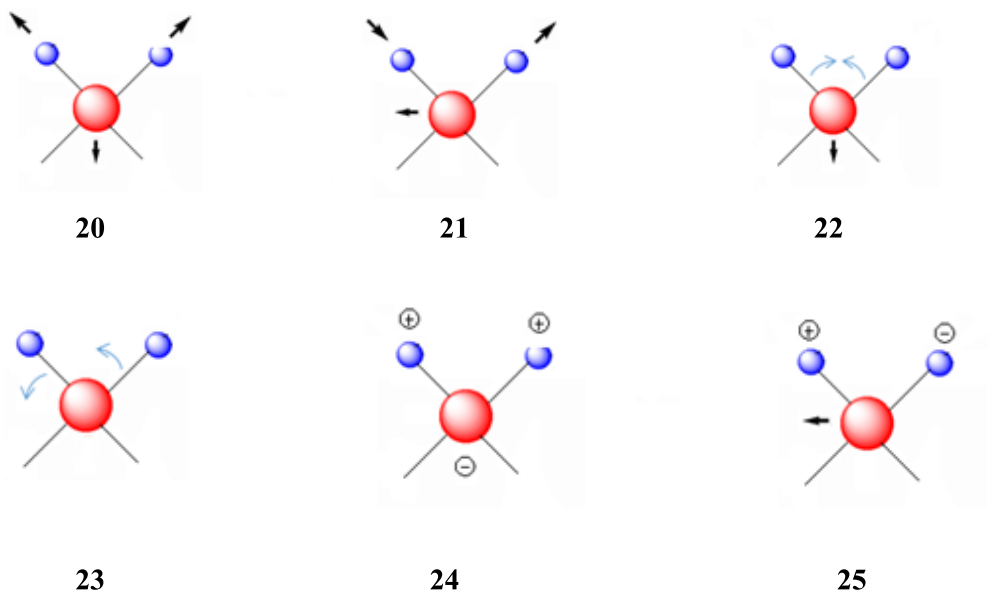
18



19



19



Gambar 11. Pola vibrasi molekul H_2O, CO_2 dan CH_2
Sumber : Silverstein *et al*., 2005.

Berdasarkan jenis gugus fungsi dan gaya konstan dari setiap ikatan, vibrasi yang muncul bersifat spesifik. Berikut ini adalah tabel serapan fungsi berdasarkan bilangan gelombang (Silverstein *et al*., 2005).

Tabel 3. Serapan gugus fungsi

Gugus fungsi	Bilangan gelombang (cm^{-1})
C=O keton	1700 - 1725
C=O aldehida	1720 - 1740
C=O asam karboksilat	1700 - 1725
C=O ester	1735 - 1750
C=O amida	1630 - 1690
C=N imina	1480 - 1690
C=C aromatik	1650 - 1450
C=C alkena	1640 - 1680
N-H amina	3300 - 3500
O-H alkohol	3200 - 3600

O-H asam karboksilat	3600 - 2500
C-H alkana	3000 - 2850
C-H alkena	3020 - 3000
C-H alkuna	3030 - 3000
C-H aromatic	3050 – 3070
C-O eter	1120 – 1140
C-O ester	1300 – 1000
C-O alkohol	1060 – 1040
C-F	1100 – 1000
C-Cl	760 – 540
C-Br	600 – 500

Sumber : Silverstein *et al*., 2005.

Beberapa senyawa yang berasal dari sponge telah berhasil diisolasi dan dianalisis gugus fungsi berturut-turut yaitu **(26)** hippospongide A memiliki vibrasi gugus O-H *stretching* pada 3386 cm^{-1} dan 1455 cm^{-1} serta vibrasi gugus C-O eter *stretching* pada 1385 cm^{-1}, **(27)** hippospongide B memiliki vibrasi gugus O-H *stretching* pada 3436 cm^{-1} dan 1461 cm^{-1} serta vibrasi gugus C-O eter *stretching* pada 1383 cm^{-1}, **(28)** ceratinadin D memiliki vibrasi gugus O-H *stretching* pada 3420 cm^{-1} dan O-H bending pada 1431 cm^{-1}, vibrasi gugus C-O eter *stretching* pada 1202 cm^{-1} (Gotsbacher and Karuso, 2015; Yu-Chia *et al*., 2012).

2.7 *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS)

Spektrokopi LC-MS merupakan dua alat yang digabungkan menjadi satu, yang berfungsi untuk memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya (Gambar 12). Setelah campuran senyawa tersebut

terpisah, maka senyawa yang terpisah akan diidentifikasi berat molekulnya (Eichhorn and Knepper, 2001).

Gambar 12. LC-MS
Sumber : Eichhorn and Knepper, 2001

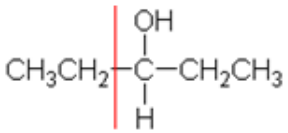
Di dalam kolom terjadi pemisahan senyawa-senyawa dalam kolom akan keluar atas dasar kepolaran yang berbeda, sehingga akan mempengaruhi kekuatan interaksi antara senyawa terhadap fase diam. Senyawa-senyawa yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar terlebih dahulu, dan sebaliknya senyawa yang berinteraksi kuat dengan fase diam akan keluar lebih lama (Skoog *et al.*, 2013; Silverstein *et al*., 2005; Ardrey, 2003).

Sampel yang telah terpisah dengan *liquid chromatography* diidentifikasi berat molekulnya menggunakan *mass spectroscopy*. Hasil spektrum *mass spectroscopy* berupa perbandingan antara intensitas (%) terhadap massa (m/z). Intensitas (%) yang paling tinggi sebagai *base peak* dan mass (m/z) yang paling besar sebagai [$M+H^+$ (Silverstein *et al*., 2005).

Menurut Silverstein *et al*. (2005) bahwa masing-masing senyawa kimia memiliki pola pemutusan ikatan fragmentasi yang khas. Faktor yang mempengaruhi pemutusan ikatan Pola fragmentasi dari gugus kimia dijelaskan berturut – turut yaitu, gugus alkohol (Gambar 13) , gugus eter (Gambar 14) dan gugus alkane (Gambar 15) yang dijelaskan sebagai berikut :

a. Gugus alkohol

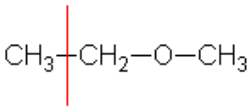
Intensitas ion molekul alkohol sangat rendah atau bahkan tidak ada. Sehingga saat ditembak elektron gugus alkohol pada senyawa yang pertama sekali terfragmentasi. Pada alkohol biasanya juga disertai hilangnya molekul H_2O.



Gambar 13. Pola fragmentasi gugus alkohol
Sumber : Silverstein *et al*., 2005

b. Gugus eter

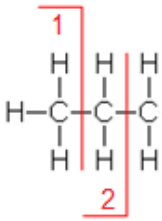
Fragmentasi gugus eter terjadi pada posisi alfa terhadap atom oksigen.



Gambar 14. Pola fragmentasi gugus eter
Sumber : Silverstein *et al*., 2005

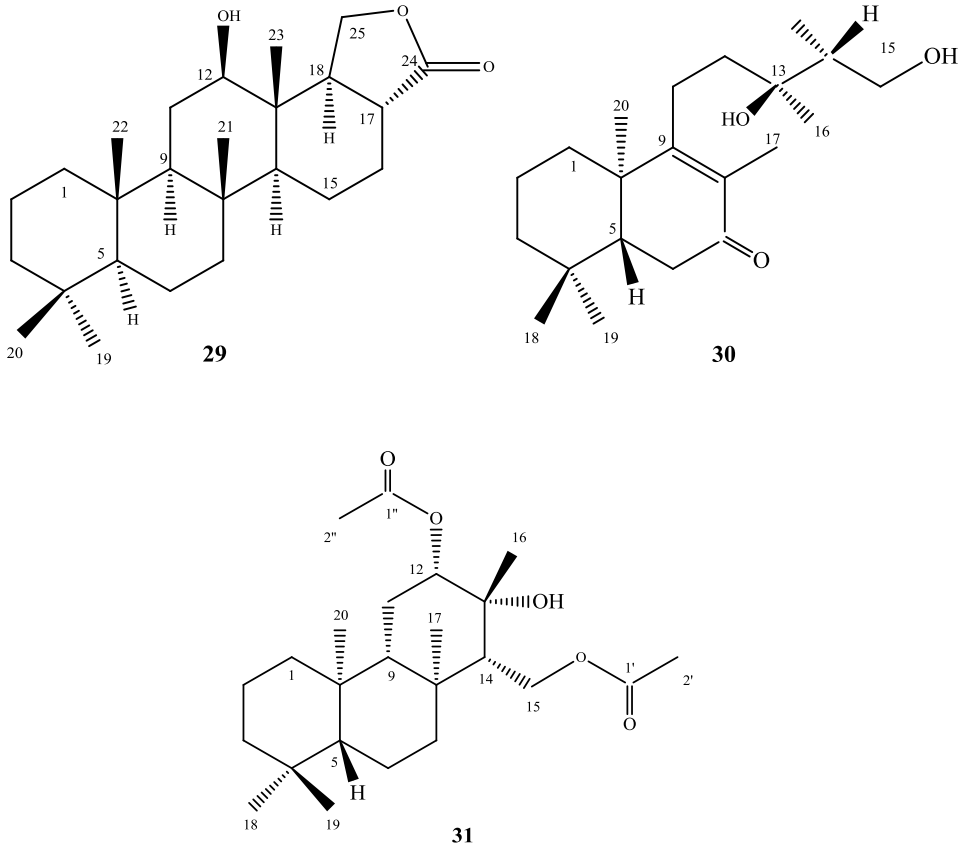
c. Alkana

Gugus alkana sangat mudah diidentifikasi karena pola fragmentasi alkana teratur. Ion alkana juga mempunyai intensitas rendah. Pada saat ditembak elektron maka gugus yang pertama sekali adalah CH_3 dan diikuti oleh fragmentasi CH_2.



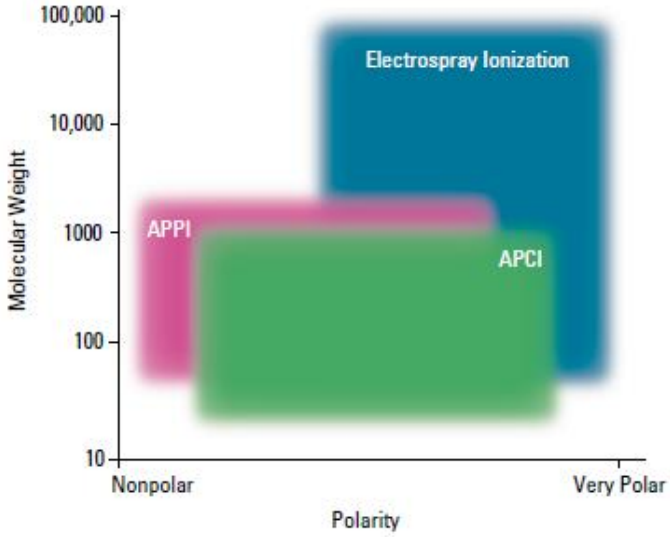
Gambar 15. Pola fragmentasi gugus alkana
Sumber : Silverstein *et al*., 2005

Beberapa senyawa yang berasal dari sponge telah berhasil diisolasi dan dianalisis berat molekul serta formula molekulnya (Gambar 16) berturut-turut yaitu **(29)** hippospongide B $[M+H]^+$ 411.287 m/z dengan formula molekul $C_{25}H_{40}O_3$, **(30)** *ent*-labdane diterpene $[M+H]^+$ 339.253 m/z dengan formula molekul $C_{20}H_{34}O_4$ dan **(31)** isocopalane diterpene diester $[M+H]^+$ 409.295 m/z dengan formula molekul $C_{24}H_{41}O_5$ (Yu-Chia *et al*., 2012; Ramiro *et al*., 2012; Wyk *et al*., 2007).



Gambar 16. Senyawa dari sponge yang berhasil dianalisis menggunakan LC-MS, **(29)** hippospongide B, **(30)** *ent*-labdane diterpene dan **(31)** isocopalane diterpene diester.

Menurut Ardrey (2003) bahwa berdasarkan tingkat polaritasnya tehnik ionisasi terbagi menjadi tiga (Gambar 17), yaitu *Atmospheric Pressure Photoionization* (APPI), *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) dan *Electrospray Ionization* (ESI).



Gambar 17. Metode ionisasi
Sumber : Ardrey (2003)

2.7.1 *Atmospheric Pressure Photoionization* (APPI)

Metode APPI digunakan dengan kromatografi fase normal untuk senyawa yang sangat nonpolar dan tingkat aliran rendah (<100 ml / menit) (Ardrey, 2003).

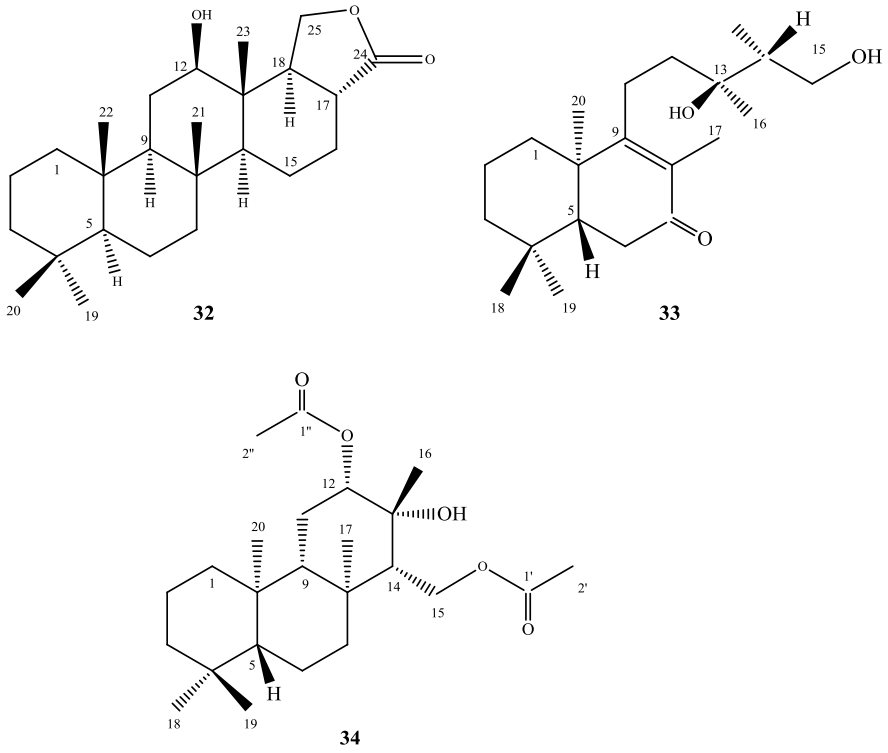
2.7.2 *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI)

Meetode APCI lebih sering digunakan dengan kromatografi fase normal karena analit biasanya nonpolar (Ardrey, 2003).

2.7.3 *Electrospray Ionization* (ESI)

ESI merupakan metode ionisasi menggunakan kromatografi fasa terbalik yang sangat berguna untuk menganalisis molekul dari ukuran kecil sampai ukuran besar yang bersifat polar maupun sangat polar. (Gostbacher and Karuso, 2015; Audoin *et al*., 2013; Ardrey, 2003).

Beberapa penelitian senyawa polar yang berasal dari sponge (Gambar 18) telah dianalisis menggunakan metode ESI yaitu **(32)** hippospongida B, **(33)** *ent*-labdana diterpen dan **(34)** isokopalana diterpen diester, (Yu-Chia *et al*., 2012; Ramiro *et al*., 2012; Wyk *et al*., 2007;). Pada penelitian ini digunakan metode ionisasi ESI karena sampel yang bersifat polar yang dikonfirmasi oleh data elusi KLT.



Gambar 18. Senyawa dari sponge menggunakan metode ESI, **(32)** hippospongida B, **(33)** *ent*-labdana diterpene dan **(34)** isokopalana diterpen diester.

2.8 *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

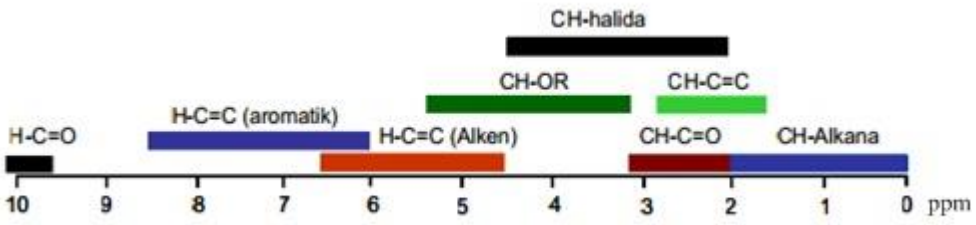
Spektroskopi NMR merupakan tehnik analisis untuk memberikan gambaran mengenai jenis atom, jumlah, maupun lingkungan atom hidrogen (^{1}H NMR) maupun karbon (^{13}C NMR) pada suatu komponen senyawa (Silverstein *et al*., 2005; Wyk *et al*., 2007). Spektroskopi NMR didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik. Spektrum ^{1}H NMR dan ^{13}C NMR sering disebut metode spektroskopi 1 dimensi (Gambar 19).

Gambar 19. Spektroskopi NMR
Sumber: Bruker, 2014.

2.8.1 ^{1}H NMR

Spektroskopi proton atau ^{1}H memberikan gambaran atom-atom hidrogen dalam sebuah molekul organik. Spektroskopi ini didasarkan pada prinsip bahwa setiap kelompok proton (H) dalam molekul organik akan beresonansi pada frekuensi yang tidak identik atau beresonansi pada frekuensi spesifik (McMurry, 2008; Silverstein *et al*., 2005). Setiap proton dalam molekul dikelilingi elektron, sehingga menimbulkan sedikit perbedaan lingkungan elektronik dari satu proton dengan proton lainnya. Proton – proton dilindungi oleh elektron – elektron yang

mengelilinginya sehingga efek dari perlindungan elektron menghasilkan medan magnet yang disebut dengan nilai pergeseran kimia (*chemical shift*). Pergeseran kimia memiliki simbol δ , yang dinyatakan sebagai bagian tiap juta (ppm) dari frekuensi radio yang digunakan (Gambar 20) (McMurry, 2008; Lambert and Mazolla, 2004).

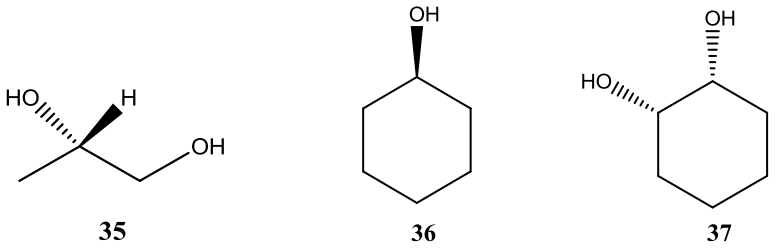


Gambar 20. ^{1}H-NMR
Sumber: Silverstein *et al*., 2005.

Menurut Silverstein *et al*. (2005) bahwa faktor yang mempengaruhi pergeseran kimia (*chemical shift*) adalah sebagai berikut :

a. Efek elektronegativitas

Suatu proton yang terikat pada atom karbon yang mengikat unsur-unsur yang elektronegatif, maka *chemical shift* dari proton tersebut akan naik dengan kenaikan elektronegativitas dari unsur yang diikat oleh atom karbon tersebut. Bagian dari senyawa sponge laut yang telah berhasil diisolasi (Gambar 21) dan memiliki efek elektronegativitas berturut-turut yaitu **(35)** hetriakontana, **(36)** hippospongida B dan **(37)** oelodiol (Ramiro *et al*., 2012; Yu-Chia *et al*., 2012; Fattorusso *et al*., 2006).



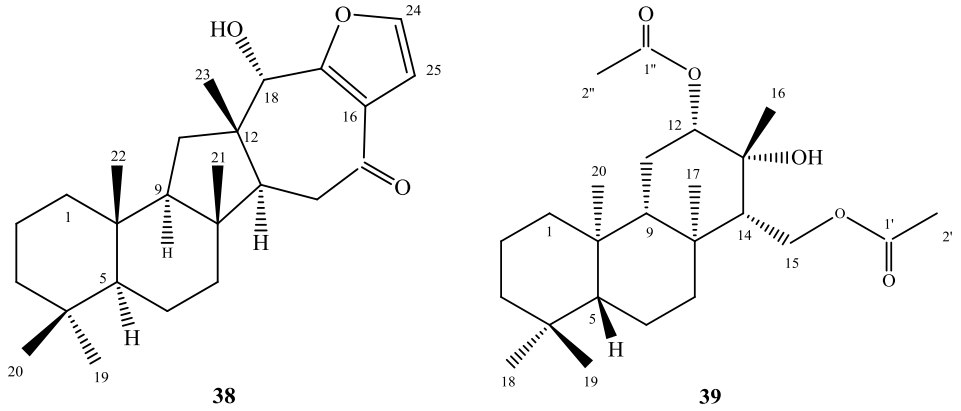
Gambar 21. Bagian dari senyawa sponge laut yang memiliki efek elektronegativitas, **(35)** hetriakontana, **(36)** hippospongida B dan **(37)** coelodiol.

b. Hibridisasi

Faktor hibridisasi dibagi menjadi 2, yaitu :

- Proton yang terikat pada atom yang hibridisasinya sp^3.
- Proton yang terikat pada atom yang hibridisasinya sp^2.

Beberapa senyawa yang berhasil diisolasi dari sponge laut (Gambar 22) dan memilik hibridisasi sp^3 dan sp^2 berturut-turut merupakan senyawa dari **(38)** hippospongida A memiliki tujuh metilen sp^3 berturut-turut pada posisi karbon C-1, C-2, C-3, C-6, C-7, C-11, dan C-14 pada pergeresan kimia (δ_C = 40.2, 18.4, 42.5, 18.8, 40.1, 35.0, 39.6 ppm) dan dua metin sp^2 berturut-turut pada posisi karbon C-24 dan C-25 pada pergeseran kimia (δ_C = 142.3, 110.9 ppm), **(39)** isokopalana diterpen diester memiliki lima metilen sp^3 berturut-turut pada posisi karbon C-1, C-2, C-3, C-6 dan C-7 pada pergeseran kimia (δ_C = 40.5, 18.9, 42.3, 18.7, 39.1 ppm) dan dua metin sp^2 berturut-turut pada posisi karbon C-5 dan C-13 pada pergeseran kimia (δ_C = 57.2, 74.6 ppm) (Yu-Chia *et al*., 2012; Wyk *et al*., 2007).

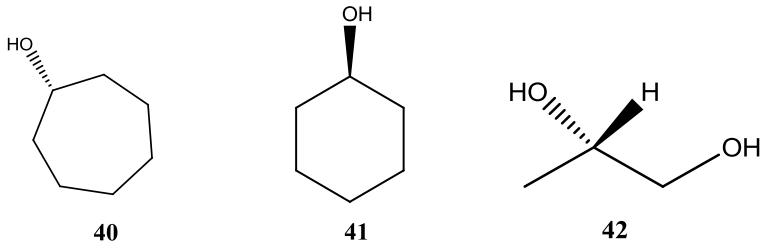


Gambar 22. Senyawa dari sponge yang memiliki hibridisasi sp^3 dan sp^2, **(38)** hippospongida A dan **(39)** isokopalana diterpen diester.

c. Ikatan hidrogen

- Proton yang dapat mengalami ikatan hidrogen, seperti –OH, -NH_2, -NRH, -SH, *chemical shift* nya terbentang pada range yang lebar. Makin tinggi tingkat hidrogen ikatan, proton makin *deshielded*.

  Beberapa senyawa yang berhasil diisolasi dari sponge laut (Gambar 23) dan memiliki ikatan hidrogen berturut-turut merupakan bagian senyawa dari **(40)** hippospongida A, **(41)** hippospongida B dan **(42)** hetriakontana (Yu-Chia *et al*., 2012; Ramiro *et al*., 2012).



Gambar 23. Senyawa sponge yang memiliki ikatan hidrogen, **(40)** hippospongida A, **(41)** hippospongida B dan **(42)** hetriakontana.

d. Pelarut.

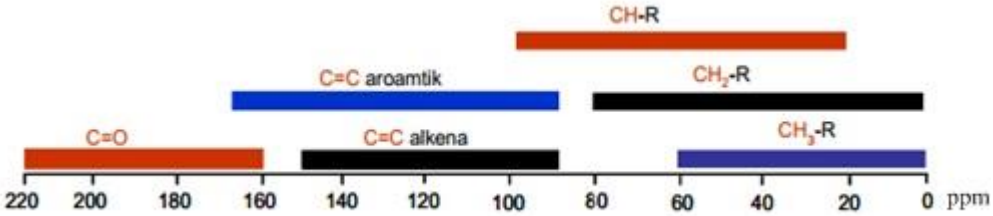
Pelarut yang digunakan merupakan pelarut yang dapat melarutkan sampel dan tidak mengganggu spektrum seperti C_6D_6, CD_3OD, $CDCl_3$, D_2O, CD_3SOCD_3 (Ramiro *et al*., 2012; Yu-Chia *et al*., 2012; Wyk *et al*., 2007; Gottlieb et al., 1997). Pelarut CD_3OD untuk senyawa polar dilaporkan masih memiliki kadar air sekitar 0,01 % sehingga akan mengganggu sinyal proton. Untuk mengatasi hal ini ditambahkan H_2O agar sinyal proton yang berasal dari CD_3OD dapat teramati jelas dan muncul pada pergeseran δ_H = 4.87 ppm dan beberapa penelitian telah dilaporkan menggunakan campuran CD_3OD dan H_2O dalam analisis ^1H NMR (Ebada *et al*., 2014; Yeon-Ju *et al*., 2014; Yu-Chia *et al*., 2012; Dai *et al*., 2010; Gottlieb *et al*., 1997).

Senyawa standar yang digunakan adalah tetrametilsilan $(CH_3)_4Si$ yang disebut TMS (Gambar 24). Senyawa ini dipilih karena proton - proton dari gugus metil jauh lebih terlindungi bila dibandingkan dengan kebanyakan senyawa cuplikan (Ramiro *et al*., 2012; Yu-Chia *et al*., 2012).

Gambar 24. *Shielded field*
Sumber : Silverstein *et al*. (2005)

2.8.2 ^{13}C NMR

Spektroskopi karbon-13 atau ^{13}C memberikan gambaran karbon-karbon dalam sebuah molekul organik. Pergeseran kimia ^{13}C antara 0 sampai dengan 220 ppm yang terbagi atas sp^3 antara 0 – 60, alkohol 60 – 80 ppm, sp antara 70 – 80 ppm, sp^2 antara 100 – 160 ppm, gugus karbonil dari gugus karboksilat, ester, lakton, amida, anhidrida, antara 160-180 ppm sedangkan aldehida antara 180 – 200 ppm dan keton antara 190 – 220 ppm (Gambar 25) (Ramiro *et al*., 2012; Yu-Chia *et al*., 2012; Wyk *et al*., 2007; Silverstein *et al*., 2005). Bentuk sinyal dari gugus metil (CH_3) berbentuk quartet (*q*), metilen (CH_2) berbentuk triplet (*t*), metin berbentuk doublet (*d*) sedangkan karbon quartener berbentuk singlet (*s*) dan rentang Pergeseran ^{13}C NMR dari 0 – 220 ppm (Ramiro *et al*., 2012; Yu-Chia *et al*., 2012; Wyk *et al*., 2007; Joseph, 1999; Roe, 1996).



Gambar 25. ^{13}C-NMR
Sumber: Silverstein *et al*., 2008